



Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DE
TEJIDO ADIPOSO DE RATA PARA LA OBTENCIÓN DE
CÉLULAS CON FENOTIPO OLIGODENDROGLIAL**

TESIS DOCTORAL
Lara Velloso
Madrid, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Dpto. de Anatomía, Histología y Neurociencia



**Diferenciación de las células estromales de tejido
adiposo de rata para la obtención de células con
fenotipo oligodendroglial.**

TESIS DOCTORAL

Lara Vellosillo Huerta

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Dpto. de Anatomía, Histología y Neurociencia



Diferenciación de las células estromales de tejido adiposo de rata para la obtención de células con fenotipo oligodendroglial.

Memoria de la Tesis para optar al grado de doctor
presentada por la Licenciada en Biología:

Lara Velloso Huerta

Director de la Tesis:

Dr. Carlos Luis Paíno Belarrinaga

Servicio de Neurobiología-Investigación

Hospital Universitario Ramón y Cajal

Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)

El Dr. Carlos Luis Paíno Belarrinaga, facultativo del Servicios de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, como director del trabajo de investigación de la Tesis Doctoral: "Diferenciación de las células estromales de tejido adiposo de rata para la obtención de células con fenotipo oligodendroglial" realizada en el servicio de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal y en el Centro de Tecnología Biomédica (CTB).

CERTIFICA:

Que este estudio experimental llevado a cabo por Lara Vellosillo Huerta es satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Dr. Carlos Luis Paíno Belarrinaga

e-mail: carlos.paino@hrc.es

Este trabajo ha sido realizado en el Servicio de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal y en el Centro de Tecnología Biomédica (CTB). Este proyecto ha sido posible gracias a una beca predoctoral otorgada por la Agencia Pedro Laín Entralgo (NDG 09/014) de la Comunidad de Madrid y al apoyo económico de EQUILAB, S.A. y ha participado en el Programa integral de Ingeniería Biomédica para el desarrollo de técnicas diagnósticas y terapéuticas en enfermedades neurológicas (NEUROTEC), Proyecto I + D en Biomedicina de la Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2460).

Dedicado a

José María Huerta Alda

Pilar Rodríguez Opic

Demetrio Vellosillo Andrés

Milagros Postigo Calonge

AGRADECIMIENTOS

Escribir estas palabras cierra una etapa de mi vida, en la que la entrega, el esfuerzo, la dedicación, pero sobre todo el aprendizaje, la experiencia y la inestimable ayuda que he recibido de cada uno de vosotros han hecho posible que hoy pueda dar por finalizado un sueño.

Gracias a mi director de tesis el Dr. Carlos Paino Belanirraga, por guiarme, enseñarme, y por todo el tiempo y esfuerzo dedicado por permitirme trabajar en una de las áreas más bonitas en la que me podía plantear, convirtiéndose en mi vocación. También quiero agradecerse a Dr. Pepe Gaztelu y a Dr. Luis Barrios por ayudarme a alcanzar mi meta.

Tantos momentos compartidos con Ana, Cris, Maca e Irene, lo que nos hemos reído y disfrutado juntas. Y a Jose, representante de los machos ibéricos, que no deja de alegrarnos las mañanas, por dejarme reutilizar tus ratillas.

A MJ Casarejos por adoptarme como una más del grupo y Juan, parece mentira que con todo lo que te has metido conmigo, el cariño que te he cogido. Gracias también Laly y Diana, por dejarme pasar más horas en vuestro laboratorio que casi en mi casa, por el apoyo y el ánimo.

Mi Maripeich, mi "directora de tesis espiritual", mi gran Gurú. Que habría hecho sin ti... No sé por dónde empezar a agradecerte todo lo que me has enseñado y apoyado en todo este tiempo, así que solo se decirte ¡GRACIAS!. Has sido como mi madre todo este tiempo y sin tus consejos y tus regañinas no hubiera sido capaz de terminar este proyecto.

Mi Lucis, amor de mis amores, mi pilar en este mundo de locos. Cuando llegue aquí pensaba que el día que me fuera me llevaría mi tesis, un gran sueño, y me he llevado algo más importante, que es una gran amistad. Tú presencia aquí, a pesar de tu ausencia física, siempre ha estado para mí. Te sigo guardando tu mesa...Gracias por todo lo que has hecho por mí.

Sin olvidarme de Silvia, Maria Jose Asensio, Toni, Jota, Ángel, Luis Oresanz, Lili, Ascen y Maica, mis vecinos de laboratorio, por todo el apoyo y la ayuda que me habéis brindado.

A ti, Adolfo, mi Rodolfo langostino, cuantas horas pasamos enseñándonos mutuamente a hacer maxis... Las tardes contigo se hacían mucho más amenas y entretenidas.

Elena, mi hortaliza favorita, tal como empezamos cuando nos conocimos, quién diría que terminaríamos siendo amigas... jejeje. Patri, señora del civis!, la enana del pasillo. A pesar de que no hemos pasado mucho tiempo juntas en este proyecto, os ha quedado lo peor de lo mejor... mis momentos pre-tesicos. Muchas gracias, por vuestras sonrisas y consejos en estos momentos.

A las chicas de bioelectromagnetismo, Maria Luisa y Maria Antonia, gracias por las aportaciones realizadas y vuestra ayuda en estos momentos, en especial en los últimos meses.

Quiero hacer una mención especial a las ratillas que han participado en mi tesis, ¡GRACIAS por dar vuestra vida por la ciencia!.

No puedo olvidarme de mis grandes compañeros de fatigas en la facultad, Elva, Fernando (papuxi), Jose Ignacio (Yellow), Rafa, Andrea y David (el gran desaparecido), porque a pesar de no haber participado en este proyecto, sin vosotros no hubiera llegado hasta aquí. Gracias por vuestra ayuda, dedicación, consejos, paciencia,... GRACIAS POR TODO, amores con muchas rrrrrs.

Gracias a las personas más importantes de mi vida, mi familia, mamá, papá, sois geniales. No tengo palabras para agradeceros lo que me habéis enseñado y por como me habéis educado, ya que sin vosotros este camino recorrido hubiera sido aún más difícil. Por vuestra compañía, apoyo, ánimo y paciencia que habéis tenido. Hermana, gracias por todos estos años de complicidad y cariño, por estar SIEMPRE a mi lado, por tus consejos y sobre todo por tu apoyo.

Por último, y no por eso menos importante a Fer, por ser el mejor compañero que pudiera tener, por tu empeño en hacerme confiar un poco más en mí durante tantos años, por tu paciencia y optimismo, por tu facilidad para hacerme sentir que nada es tan complicado, y fundamentalmente por el cariño que me has brindado. ¡Mil gracias!

¡¡¡HABEMUS TESIS!!!

"Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio
cerebro".

Santiago Ramón y Cajal

"Si hay algo en nosotros verdaderamente divino, es la voluntad. Por ella afirmamos la personalidad, templamos el carácter, desafiamos la adversidad, reconstruimos el cerebro y nos superamos diariamente".

Santiago Ramón y Cajal

Índice

RESUMEN/ABSTRACT	9
ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	21
1. Oligodendrocitos. Definición y funciones.....	23
2. Formación de los oligodendrocitos.....	23
2.1. Origen.....	23
2.2. Expresión de marcadores en el desarrollo de los oligodendrocitos.....	24
3. Mielinización.....	29
3.1. Oligodendrocitos.....	29
3.2. Otras células con capacidad de mielinizar.....	32
3.2.1. Células de Schwann.....	32
3.2.2. Glía envolvente olfatoria.....	32
4. Enfermedades desmielinizantes.....	33
4.1. Tipos.....	33
4.1.1. Autoinmunes.....	33
4.1.2. Leucodistrofias.....	34
5. Terapia celular sustitutiva.....	35
5.1. Células madre o troncales.....	35
5.2. Diferenciación neuronal para la terapia celular.....	37
5.2.1. Transdiferenciación neural.....	38
5.2.2. Transdiferenciación neural por reprogramación directa.....	40

HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	43
MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
1. Materiales y reactivos.....	49
1.1. Anticuerpos.....	49
1.2. Enzimas para la construcción plasmídica.....	52
1.3. Plásmidos para la reprogramación directa.....	52
1.4. Reactivos para cultivos celulares.....	53
1.5. Reactivos para Inmunocitoquímica.....	54
1.6. Reactivos para la producción de Lentivirus.....	55
1.7. Reactivos para RT-PCR.....	55
1.8. Reactivos para el test de multipotencialidad de las células mesenquimales...56	
1.9. Reactivos para western blot.....	56
1.10. Primers.....	58
2. Animales utilizados.....	59
3. Medios de cultivo.....	59
4. Cultivos celulares.....	61
4.1. Células mesenquimales de rata.....	61
4.2. Células mesenquimales humanas.....	62
4.3. HEK 293T.....	62
5. Test de multipotencialidad.....	62
6. Obtención de fenotipo oligodendrocítico.....	65
6.1. Inducción farmacológica.....	65
6.2. Reprogramación celular directa.....	66
7. Construcciones plasmídicas.....	68

7.1. rMBP-LeGO-C.....	68
7.2. hGFAPp-LeGO-G.....	69
8. Técnicas de Biología molecular.....	71
8.1. Inmunocitoquímica.....	71
8.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas.....	72
8.3. RT-PCR.....	74
8.4. Purificación del ADN plasmídico.....	75
8.5. Adición del fragmeto de farnesilación.....	75
8.6. Producción, concentración y titulación lentiviral.....	77
8.7. Transducción de células mesenquimales.....	79
8.8. Inmunoselección magnética de células O4 ⁺	79
9. Estudio de la funcionalidad de las células transdiferenciadas.....	80
9.1. Obtención y cultivo de neuronas de los ganglios dorsales.....	80
9.2. Mielinización en cultivo.....	81
RESULTADOS.....	83
1. Obtención de fenotipo oligodendrocítico por inducción farmacológica.....	85
1.1. Tratamientos inductores para la diferenciación oligodendroglial.....	87
1.1.1. Caracterización inmunocitoquímica de las rADSC tras los tratamientos inductores.....	88
a) Marcaje con O1.....	88
a) Expresión de proteínas y péptidos propios de oligodendrocitos en rADSC.....	95
1.1.2. Caracterización de las rADSC por western blot.....	99
1.1.3. Caracterización de las rADSC por RT-PCR.....	101
1.2. Estudio de la mielinización en cultivo: co-siembra sobre cultivos de neuronas de ganglios de las raíces dorsales.....	102
2. Transdiferenciación de células mesenquimales a oligodendrocitos mediante	

reprogramación directa.....	103
2.1. Constructos genéticos para la reprogramación.....	103
2.2. Transdiferenciación de las células mesenquimales.....	106
2.3. Pretratamiento para favorecer la transdiferenciación.....	108
2.3.1. Base lógica de los pretratamientos utilizados.....	111
d) Adipogénico.....	111
d) Ácido retinoico.....	113
d) RepSox.....	113
d) Combinaciones de pretratamientos.....	114
3. Selección con Zeocina.....	116
4. Características inmunocitoquímicas de las células reprogramadas con SOZ.....	116
5. Efecto de los diferentes pretratamientos sobre las características inmunocitoquímicas de las rADSC reprogramadas.....	120
6. Selección inmunomagnética de las células O4 positivas en rADSC.....	121
7. Análisis de células reprogramadas por RT-PCR.....	122
8. Estudio de la mielinización en cultivo: co-siembra de células reprogramadas sobre neuronas ganglionares de las raíces dorsales.....	124
DISCUSIÓN.....	133
1. Transdiferenciación neural farmacológica.....	135
1.1. Efecto de los tratamientos inductores sobre el marcaje con O1.....	136
1.2. Efecto de los tratamientos inductores sobre la expresión de moléculas propias de oligodendrocitos.....	137
1.3. ¿Tienen las ADSC capacidad de mielinizar axones?.....	138
2. Transdiferenciación glial por reprogramación directa.....	139
2.1. Transducción de factores de transcripción prooligodendrogiales en ADSC.....	140
2.2. Selección de precursores de oligodendrocitos transdiferenciados...143	
2.3. Inclusión de pretratamientos en los procedimientos de transdiferenciación por reprogramación directa.....	145

2.4. Funcionalidad de los oligodendrocitos obtenidos por transdiferenciación de rADSC.....	150
--	-----

CONCLUSIONES.....	153
--------------------------	------------

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
--	------------

Resumen

La obtención de células oligodendrogiales a partir de tejidos no esenciales y accesibles es de gran interés, tanto para el desarrollo de terapias de reemplazo celular en enfermedades desmielinizantes, como para el estudio de las patologías que afectan a la mielinización.

Las células estromales de tejido adiposo (ADSCs) en cultivo poseen características de multipotencialidad, pudiendo dar lugar a diversos tipos celulares diferenciados. Estudios previos de nuestro grupo han observado la expresión de moléculas propias de células mielinizantes, entre ellos el galactocerebrósido (GalC), en las ADSC en condiciones basales de cultivo. La primera parte del presente trabajo estudia el efecto de componentes de algunos de los tratamientos inductores neurales publicados sobre la expresión de dichas moléculas. Combinaciones que incluyen ácido retinoico, dibutilil AMP cíclico y factores como EGF, FGFb y/o PDGF produjeron un gran aumento en el número de células que expresaban GalC. Sin embargo, las células obtenidas tras estos tratamientos no eran capaces de mielinizar axones en cultivo, por lo que se descarta que estos tratamientos inductores produzcan una transdiferenciación de las ADSC hacia oligodendrocitos funcionales.

La segunda parte del trabajo estudia la transdiferenciación de ADSC de rata mediante reprogramación celular directa por factores de transcripción para obtener oligodendrocitos. Las ADSC se transdujeron lentiviralmente con combinaciones de transgenes inducibles por tetraciclina para sobreexpresar Sox10 (S), Olig2 (O), Zfp536 (Z) y/o Nkx6.1 (N). Utilizando la combinación Sox10-Olig2-Zfp536 (SOZ) se generaron células con morfología oligodendroglial y marcaje *de novo* con el anticuerpo monoclonal O4, que se identificaron como precursores de oligodendrocito (PCOs). Posteriormente el cultivo presentaba células refringentes, pequeñas y ramificadas con GalC en sus membranas, identificadas como oligodendrocitos. Además, se generaron células que expresaban intensamente GFAP y/o p75NTR. Tras 3 meses de cultivo, más del 50% de la población celular transducida con SOZ era O4+. Además, estos cultivos expresaban proteínas de la mielina como MBP, MAG, MOG y PLP1/DM20.

Entre los diferentes pretratamientos utilizados para incrementar la eficiencia de reprogramación sólo la prediferenciación adipogénica produjo mejoras, mientras que el ácido retinoico, RepSox o combinaciones de éstos fueron menos eficientes.

Las células transdiferenciadas se cultivaron sobre neuronas de ganglios de la raíz dorsal, demostrándose que eran capaces de establecer envolturas tipo-mielina a lo largo de varios tramos de axón, lo que confirma la funcionalidad

oligodendroglial de las células reprogramadas. El tratamiento con benztropina, además, produjo una maduración de las envolturas mielínicas.

Estos resultados demuestran la generación eficiente de oligodendrocitos funcionales a partir de ADSC de rata adulta mediante reprogramación celular directa con factores de transcripción. Este tipo células podría ser utilizado en diversos aspectos terapéuticos o diagnósticos de medicina personalizada para las enfermedades desmielinizantes.

Obtaining oligodendroglial cells from dispensable tissues would be of great interest for autologous or immunocompatible cell replacement in demyelinating diseases as well as for studying myelin pathologies.

Adipose tissue-derived stromal cells (ADSCs) in culture show multipotentiality, giving rise to several differentiated cell types. Previous studies from our group have shown that ADSCs cultured in basal conditions express several molecules that are typical of myelinating cells, such as galactocerebroside (GalC). In the present work, the first part studies the action of published neural-inducing treatments on the expression of those molecules. Combinations that included retinoic acid, dibutyryl cAMP, and factors such as EGF, bFGF and/or PDGF greatly increased the number of GalC+ cells. However, the cells that were obtained after those treatments were not capable of myelinating axons in culture, so the possibility that those inducing treatments had transdifferentiated ADSCs into functional oligodendrocytes was discarded.

The second part of the work studies how ADSCs can be transdifferentiated by direct reprogramming with transcription factors to generate oligodendrocytes. Rat ADSCs were lentivirally transduced with combinations of tetracyclin-inducible transgenes to overexpress Sox10 (S), Olig2 (O), Zfp536 (Z) and/or Nkx6.1 (N). When using the Sox10-Olig2-Zfp536 (SOZ) combination, cells with oligodendroglial morphology and *de novo* labelling with O4 monoclonal antibody were generated and were identified as oligodendrocyte precursors (OPCs). Afterwards, the cultures contained small, branched and refringent cells, with GalC in their membranes, supposed to be oligodendrocytes. Furthermore, many cells intensely expressed GFAP and/or p75NTR. After 3 months of culturing, more than 50% of the cells in the SOZ-reprogrammed culture were O4+. Additionally, these cultures expressed myelin proteins such as MBP, MAG, MOG and PLP1/DM20.

Among the different pre-treatments that were tried for increasing the efficiency of reprogramming, only adipogenic pre-differentiation improved the yield of OPCs, whereas retinoic acid, Repsox or combinations of them were less efficient.

Transdifferentiated cells, cultured with dorsal root ganglion neurons, extended myelin-type ensheathments along several axonal segments, which confirms that these cells are actually functional oligodendrocytes. Treating the co-cultures with benztropine stimulated the maturation of these oligodendrocytes and their myelin ensheathments.

The present results show that functional oligodendrocytes can be generated from adult rat ADSC by direct reprogramming with transcription factors. This cell type could be used in several therapeutic or diagnostic approaches for the personalised medicine of demyelinating diseases

Abreviaturas

α20	Medio modificado para el mantenimiento de células mesenquimales de rata
ADN o DNA	Ácido desoxirribonucleico
ADSC	células estromales de tejido adiposo
rADSC	células estromales de tejido adiposo de rata
hADSC	células estromales de tejido adiposo de humano
dbcAMP	Dibutiril AMP ciclico (del inglés <i>dibutyril cAMP</i>)
ARN o RNA	Ácido ribonucleico
BCA	Ácido bicinconínico
BDNF	Factor neurotróficoderivado de cerebro
BHA	Butil hidroxianisol
BMPs	Proteína morfogenéticas óseas
BMSC	células madre mesenquimales del estroma de la médula ósea (del inglés <i>Bone marrow stromal cells</i>)
bp	Pares de bases
CNPasa	2',3'nucleótido cíclico 3'fosfodiesterasa
CNTF	Factor neurotrópico ciliar
D10	Medio de mantenimiento 293T y Medio utilizados para el test de multipotencialidad
DNA	
cDNA	DNA copia
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>epidermal growth factor</i>)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés <i>fibroblast growth factor</i>)
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico (del inglés <i>basic fibroblast growth factor</i>)
FGFR	Receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos
FW	Cebador directo (del inglés <i>Forward primer</i>)
GalC	Galactocerebrósido
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial

hGFAPp-LeGO-G	Plásmido generado en el laboratorio
IBMX	3-isobutil-1-methylxanthina
IGF 1	Factor de crecimiento insulínico 1
MACS	Células activadas magnéticamente
MAG	Glicoproteína asociada a la mielina
MBP	Proteína básica de la mielina
rMBP-LeGO-C	Plásmido generado en el laboratorio
MesenPRO	Medio de mantenimiento de células mesenquimales de humanas
MOG	Glicoproteína oligodendrocitaria de la mielina
MOI	Multiplicidad de infección
MSC	Células madre mesenquimales
NB	neurobasal media
NBB27	Medio definido
NG₂	Condrotin sulfato proteoglicanos 4
NGF	Factor de crecimiento nervioso (del inglés <i>Nerve growth factor</i>)
NRG1	Neuregulina
NT3	Neurotrofina-3
dNTPs	desoxirribonucleósidos trifosfato
O2A	Oligodendrocito 2 astrocito (progenitores bipotentes)
OL	Oligodendrocitos
Olig2	Factor de transcripción de oligodendrocitos
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCO	Precusores de oligodendrocitos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés <i>platelet derived growth factor</i>)
PDGFRα	Receptor alfa para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés <i>platelet derived growth factor</i>)
PFA	Paraformaldehido
PLP	Proteína proteolípida

PM	Marcador de peso molecular
iPS	Célula madre pluripotente inducida
PSA-NCAM	Molécula de adhesión celular neuronal unida a ácido polisiálico
RA	ácido trans-retinoico (del inglés <i>retinoic acid</i>)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RV	Cebador inverso (del inglés <i>Reverse primer</i>)
SFFV	Promotor constitutivo
Shh	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
T3	Hormona tiroidea tipo 3
TNF	Factor de necrosis tumoral
UGT8	UDP galactosa:ceramida galactosiltransferasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
Zfp	<i>Zinc finger protein</i>

Abreviaturas que se utilizarán para la obtención de oligodendrocitos mediante inducción farmacológica:

P	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB)
A	Dibutiril AMP ciclico (dbcAMP)
N	Neurotrofina-3 (NT ₃)
F	Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)
E	Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
RA	Ácido retinoico

Abreviaturas que se utilizarán para la obtención de oligodendrocitos mediante reprogramación:

Factores de Transcripción

S	Tet-O-FUW-Sox10
O	Tet-O-FUW-Olig2
N	Tet-O-FUW-Nkx6.1
Z	Tet-O-FUW-Zfp536

Pre-tratamientos

a	Cóctel Adipogénico
R	Ácido retinoico
X	RepSox

Introducción

1. Oligodendrocitos. Definición y funciones

Los oligodendrocitos (OLs) fueron descritos en 1921 por Pío del Río Hortega como la glía de escasas radiaciones u oligodendroglía. Utilizando técnicas de impregnación metálica (cloruro de platino, carbonato arsénico y oro sublimado) describió la oligodendroglía como *"asociación de elementos neurológicos abundantísimos, con soma generalmente pequeño, del que emana un variable número de expansiones filiformes o laminares, las cuales se dividen varias veces, siguiendo el curso de fibras mielínicas (envolviéndolas casi completamente) y formando, en total, un plexo retiforme que rodea al conjunto de formaciones nerviosas"* (Río-Hortega, 1920; Río-Hortega, 1922).

Los oligodendrocitos pueden ser identificados y clasificados en tres tipos teniendo en cuenta su localización y marcadores específicos: oligodendrocitos satélites, interfasculares e intermedios. Los oligodendrocitos satélites o perineuronales son de pequeño tamaño (10µm), su localización está restringida a la materia gris contactan la superficie del cuerpo neuronal, lo que sugiere un papel importante en el mantenimiento de la fisiología de las neuronas (Ludwin, 1979). Los oligodendrocitos interfasculares tienen un tamaño medio (20µm), que puede disminuir en el adulto (10-15µm), presentan un núcleo que ocupa un elevado porcentaje del volumen total del soma de la célula, se localizan en la materia blanca donde se disponen en paralelo a lo largo de los axones mielinizados, son los responsables de los procesos de mielinización durante el desarrollo y se encargan de producir las vainas de mielina en el adulto. Los oligodendrocitos intermedios se cree que son células precursoras que pueden dar lugar tanto a los interfasciculares como a los satélites y se distribuyen ampliamente a través de las materias blanca y gris.

2. Formación de los oligodendrocitos

2.1. Origen

La mayor parte de nuestro conocimiento sobre la biología de los OLs y de la vaina de mielina que forman se deriva de estudios en roedores.

Los OLs surgen tanto de la médula espinal como del cerebro. En la médula espinal, la mayoría de los OLs proceden de una región especializada de la zona ventricular ventral donde se generan en primer lugar precursores de las neuronas motoras y posteriormente precursores de OLs (PCO) (Sun y cols., 1998; Lu y cols., 2002). Los PCOs migran hasta su destino final donde se diferencian en OL maduros

capaces de formar vainas de mielina. Con posterioridad, surge en la médula espinal dorsal una fuente adicional de PCO (Cai y cols., 2005; Vallstedt y cols., 2005).

En el cerebro anterior, los primeros PCO se originan en la eminencia ganglionar medial y en el área entopeduncular anterior del prosencéfalo ventral. Estos PCO pueblan la totalidad del telencéfalo embrionario incluyendo la corteza cerebral y a continuación se unen a una segunda ola de PCO derivados de las eminencias ganglionares laterales y/o caudales. Adicionalmente, se ha propuesto que los PCO se generan también en la corteza postnatal (Kessaris y cols., 2006).

Cualquiera de estas poblaciones de PCO tiene que viajar largas distancias para llegar a su destino final. Esta migración está dirigida por moléculas quimiotácticas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Redwine y cols., 1997; Spassky y cols., 2001) o el factor de crecimiento de hepatocitos (Yan y Rivkees, 2002; Ohya y cols., 2007). Además, esta migración está controlada por proteínas de la matriz extracelular (Wang y cols., 1994; Kiernan y cols., 1996; de Castro y Bribian, 2005). Una vez situados en su destino final, la gran mayoría de PCOs se diferencian a OLs maduros productores de mielina, mientras que algunos PCOs persisten en la edad adulta (Bradl y Lassmann, 2010).

2.2. Expresión de marcadores en el desarrollo de los oligodendrocitos

El desarrollo oligodendroglial ha sido caracterizado en base a la expresión de marcadores específicos (Fig.1 y 2). La expresión secuencial de estos marcadores divide el linaje en distintas etapas fenotípicas que difieren tanto en su morfología como en su capacidad de proliferación y habilidades migratorias. Así se pueden distinguir: 1) progenitores neurales, 2) progenitores gliales, 3) progenitores OL, 4) PCOs y 5) OLs maduros. Aunque algunos marcadores son muy útiles para determinar el estadio de maduración de los OLs en cultivo, *in situ* su utilización es más compleja debido a que algunos de ellos están presentes en otros tipos celulares del cuerpo. Además, hay que tener presente que tales estudios se han realizado en animales de experimentación, principalmente roedores, y no son extrapolables totalmente a los humanos.

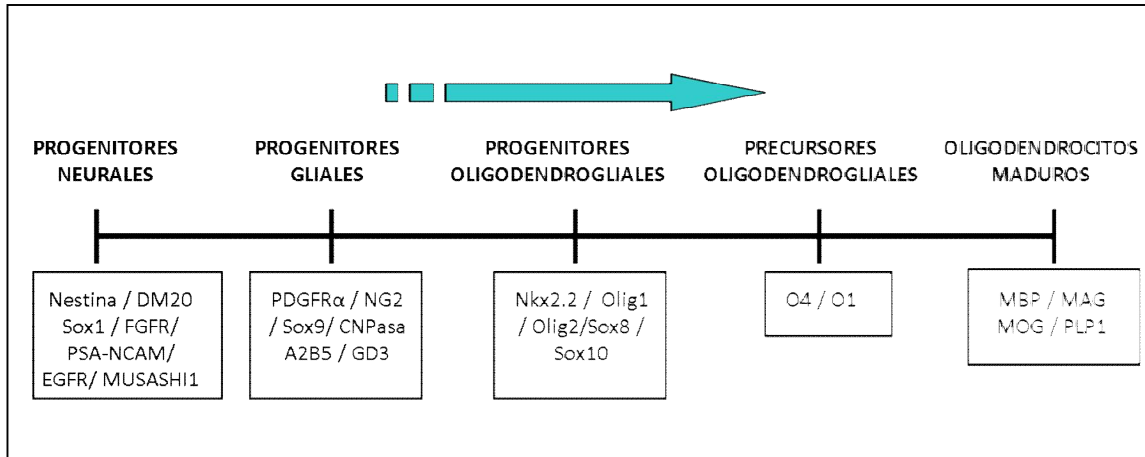


Figura 1. Representación del comienzo de la expresión de marcadores en el desarrollo de los OLs

Los progenitores son células multipotentes, es decir, pueden dar lugar a más de un tipo celular (Sohur y cols., 2006).

Los progenitores neurales se caracterizan por la expresión de las proteínas Nestina, Musashi1, PSA-NCAM y DM20. La Nestina forma parte de los filamentos intermedios de las células madre del tubo neural (Hockfield y McKay, 1985). Musashi1 se expresa en las células mitóticas y deja de expresarse en las células postmitóticas (Sakakibara y cols., 1996; Kaneko y cols., 2000). La molécula de adhesión celular neuronal unida al ácido polisialílico (PSA-NCAM) se expresa en progenitores neurales, y neuroblastos (Marmur y cols., 1998; Keirstead y cols., 1999). La isoforma de la proteína proteolípida (PLP) DM20, se encuentra en etapas más tempranas del desarrollo, antes del inicio de la mielinización (Timsit y cols., 1992; Timsit y cols., 1995; Fanarraga y cols., 1996). También se observa expresión de los factores de transcripción sox1 y sox9, del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Tropepe y cols., 1999; Aubert y cols., 2003; Cai y cols., 2004) y de receptores para factores de crecimiento de fibroblastos (FGFRs), que estimulan la proliferación y bloquea la diferenciación de los OL (Fig.1).

Los progenitores gliales se distinguen por su expresión del receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α), (Pringle y cols., 1992). Además, presentan el condrotín sulfato proteoglicano 4 (CSPG4, también conocido como NG2), cuya expresión, junto con la del PDGFR α se mantiene hasta la diferenciación de los OLs (Stallcup y Beasley, 1987; Butt y cols., 1999). A lo largo de su diferenciación, los OLs expresan característicamente la enzima 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa), que tiene dos isoformas que difieren en el extremo 5' del mRNA: CNPasa II, que se expresa en precursores gliales, y CNPasa I, que junto con la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteína

proteolípida (PLP1) se expresa durante la mielinización (Scherer y cols., 1994; Yu y cols., 1994; Watanabe y cols., 2006). Por otra parte, las hormonas tiroideas actúan en múltiples etapas del desarrollo de los OLs. En cultivo, la triyodotironina (T3) aumenta la expresión de receptores que responden a FGF2, estimulando la supervivencia, proliferación y derivación oligodendroglial de células PSA-NCAM+ (Ben-Hur y cols., 1998).

El anticuerpo monoclonal A2B5 fue inicialmente producido como un marcador de membrana específico de neuronas y células β pancreáticas (Eisenbarth y cols., 1979), pero posteriormente se descubrió que, en cultivos de células del nervio óptico, el cual carece de neuronas, el marcaje de A2B5 se correspondía con progenitores bipotentes gliales. Estas células fueron denominadas O2A para describir que daban lugar a oligodendrocitos (cuando son cultivados con una bajo porcentaje de suero y factores tróficos como PDGF y EGF) y a astrocitos tipo 2 (cuando son cultivados con un 10% de suero) (Raff y cols. 1983) (Bogler y cols., 1990). Estos progenitores O2A se pueden obtener de distintas zonas del sistema nervioso central (SNC) fetal y adulto. El anticuerpo A2B5 detecta el gangliósido de membrana GT3 y su derivado O-acetilado. Otro gangliósido específico de la superficie de los progenitores gliales es el GD3.

Estudios realizados en las últimas dos décadas han puesto de manifiesto la existencia de una consistente población de células gliales *in vivo*, tanto en el animal en desarrollo como en el SNC adulto, que se han denominado "polidendrocitos" por su morfología y su relación con los OLs. Los polidendrocitos se definen como células del parénquima del SNC, no vasculares, que expresan el proteoglicano NG2 (Nishiyama, 2007). Se sabe que los polidendrocitos son células progenitoras que dan lugar a OLs en el desarrollo y sirven como fuente primaria de las células en lesiones desmielinizantes para remielinizar las zonas afectadas. Se ha especulado que los polidendrocitos también dan lugar a una subpoblación de astrocitos protoplásmicos en la materia gris, pero no generan astrocitos en la sustancia blanca (Zhu y cols., 2008).

En la siguiente estadio se tienen las células unipotentes (que solo pueden dar lugar a un tipo celular) pero aún no son maduras y son lo que denomina progenitores de oligodendrocito (Sohur y cols., 2006).

Los progenitores de oligodendrocitos mas tempranos se caracterizan por la expresión de los factores de transcripción Nkx2.2., SoxE (Sox8, Sox9 y Sox10) y Olig (Olig1 y Olig2). La expresión de Nkx2.2 se requiere para la diferenciación normal de los OLs (Xu y cols., 2000). Cuando los progenitores de oligodendrocitos

se diferencian a OLs mielinizantes la expresión de Nkx2.2 se ve disminuida mientras que los factores de transcripción Olig se mantienen (Fancy y cols., 2004). Olig2 interviene en la especificación temprana y Olig1 interviene en la maduración de los OL (Lu y cols., 2000; Ligon y cols., 2004). En el sistema nervioso, Sox8 se expresa selectivamente en el linaje de los OLs, después de Sox9 pero antes que Sox10 y su ausencia no impide la especificación oligodendroglial en sí, pero colabora en ello con Sox9 (Stolt y cols., 2003) que sí juega un papel esencial en este proceso (Stolt y cols., 2002; Stolt y cols., 2003; Stolt y cols., 2004). Sox10 es necesario para la diferenciación terminal del OL (Stolt y cols., 2002). El solapamiento de la expresión de los SoxE hace que exista una compensación en los casos en los que se hay ausencia de uno de los subtipos.

Los progenitores de oligodendrocito en una etapa más diferenciada se denominan precursores de oligodendrocito (PCOs) y se caracterizan por la expresión de sulfátidos que son detectados específicamente por el anticuerpo monoclonal O4, lo que convierte a este anticuerpo en el primer marcador de superficie específico para el linaje oligodendroglial (Schachner y cols., 1981; Sommer y Schachner, 1981, 1982). El anticuerpo O1 (Sommer y Schachner, 1981, 1982) es una IgM que detecta galactolípidos, de los cuales el galactocerebrósido se encuentra en mayor concentración, en la membrana de los oligodendrocitos (y células de Schwann del SN periférico) y en su mielina (Pieringer y cols., 1973; Burgisser y cols., 1988). El anticuerpo monoclonal O1 ha sido ampliamente utilizado por muchos grupos de investigación para la identificación de oligodendrocitos maduros del inicio de la mielinización. En su fase inicial, los PCOs O4⁺ no expresan en sus membranas el galactocerebrósido (GalC) y mas adelante el 80% de ellos se convertirán en OLs funcionales. Las células O4⁺ van dando paso a células O1⁺ en las fases más tardías del estadio PCO (Schachner y cols., 1981; Sommer y Schachner, 1981, 1982; Gard y Pfeiffer, 1989; Ono y cols., 1995).

La maduración de los OL se caracteriza por la expresión de proteínas de la vaina de mielina. Las primeras que se expresan y aparecen en el periodo postnatal son la proteína básica de la mielina (MBP), que se distribuye de manera difusa en el citoplasma, y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), que se observa en la zona periaxonal y zonas no compactas de la vaina de mielina. El MBP es un constituyente principal de la mielina de oligodendrocitos y de células de Schwann, teniendo un papel imprescindible en la formación de la envoltura miélinica. Distintas isoformas producidas por *splicing* alternativo de su gen predominan en diferentes etapas del desarrollo de la mielina, siendo la isoforma de 18.5 kDa la más abundante en el SNC adulto. La MBP se puede detectar tempranamente en el

desarrollo en los cerebros de embriones humanos, pero esta expresión se ha atribuido a Golli, una isoforma de MBP que también se localiza fuera del sistema nervioso y que parece participar en otros procesos celulares (Sternberger y *cols.*, 1978). MAG es una proteína transmembrana específica de las células formadoras de la mielina tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP), presente también en individuos adultos, implicada en el proceso de enrollamiento del OL alrededor del axón, y el mantenimiento de la mielina (Dubois-Dalcq y *cols.*, 1986). Más adelante, se observa la expresión de la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), identificada por primera vez por un anticuerpo policlonal dirigido contra el antígeno llamado M2 que induce la encefalomiелitis autoinmune. MOG fue identificada posteriormente como una glicoproteína específica del SNC, no observándose la mielina de las células de Schwann del SNP. Por ello, se utiliza como marcador tardío en la maduración de los OLs, posiblemente restringido a aquellos que están mielinizando (Pham-Dinh y *cols.*, 1993; Solly y *cols.*, 1996). La proteína proteolípida (PLP1) es la proteína predominante de la mielina del SNC, aunque también se detecta en el SNP (Timsit y *cols.*, 1995; Fanarraga y *cols.*, 1996; Shy y *cols.*, 2003). En contraste, la proteína cero (P0), que es la mayoritaria en la mielina del nervio periférico, no se expresa en el oligodendrocito de mamíferos (Lemke y *cols.*, 1988).

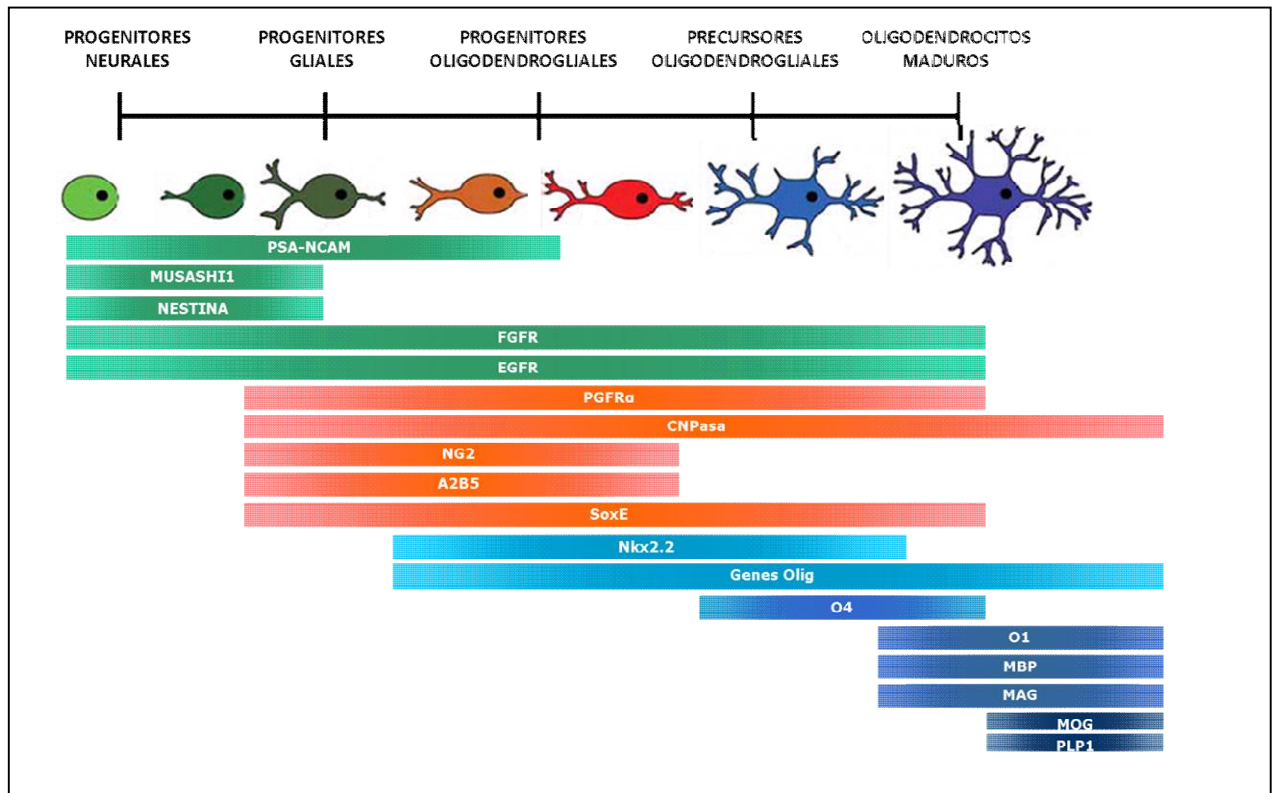


Figura 2. Representación de la expresión de marcadores en el desarrollo de los OLs. Adaptado de (de Castro y Bribian, 2005).

3. Mielinización

3.1. Oligodendrocitos

La mielina, denominado así por Rudolf Ludwig Karl Virchow 1856, es una estructura en espiral formada por las extensiones de la membrana plasmática de los OLS en el SNC y de las células de Schwann en el SNP.

La mielina está compuesta aproximadamente, en peso seco, por un 70% de lípidos y un 30% de proteínas, y tiene un bajo contenido en agua. Esta composición es distinta de la de las membranas celulares del resto de los tejidos, acorde con su papel aislante dentro de su función de conducción del impulso nervioso. Los lípidos que constituyen mayoritariamente la mielina son colesterol, fosfolípidos y glucolípidos en una proporción 4:3:2. Una de las principales características de los lípidos de los OLS y la mielina es su riqueza en glucoesfingolípidos, en particular las galactosilceramidas o galactocerebrósidos (GalC) y sus derivados sulfatados, las sulfogalactosilceramidas o sulfátidos. Esto proporciona a la mielina unas características inusuales en relación al resto de las membranas plasmáticas.

Los componentes proteicos más importantes, constituyendo el 80% del total de proteínas de la mielina, son MBP y PLP1, existiendo otras proteínas minoritarias como MAG y MOG (Baumann y Pham-Dinh, 2001).

En general, a lo largo del eje longitudinal de una fibra mielinizada podemos distinguir diferentes estructuras como son el nodo de Ranvier, el paranodo, el yuxtaparanodo y el internodo, siendo este último la zona realmente recubierta por la membrana de mielina. El nodo de Ranvier es una región de la membrana del axón localizada entre dos vainas de mielina adyacentes. Los canales de sodio se concentran en una alta densidad en el nodo, y son esenciales para la generación del potencial de acción durante la conducción saltatoria a lo largo del axón. Debido a las propiedades aislantes de la mielina, dispuesta de forma discontinua en el axón, el potencial de acción se desplaza saltando de un nodo de Ranvier a otro, por lo que se le denomina conducción saltatoria (Nave y Trapp, 2008).

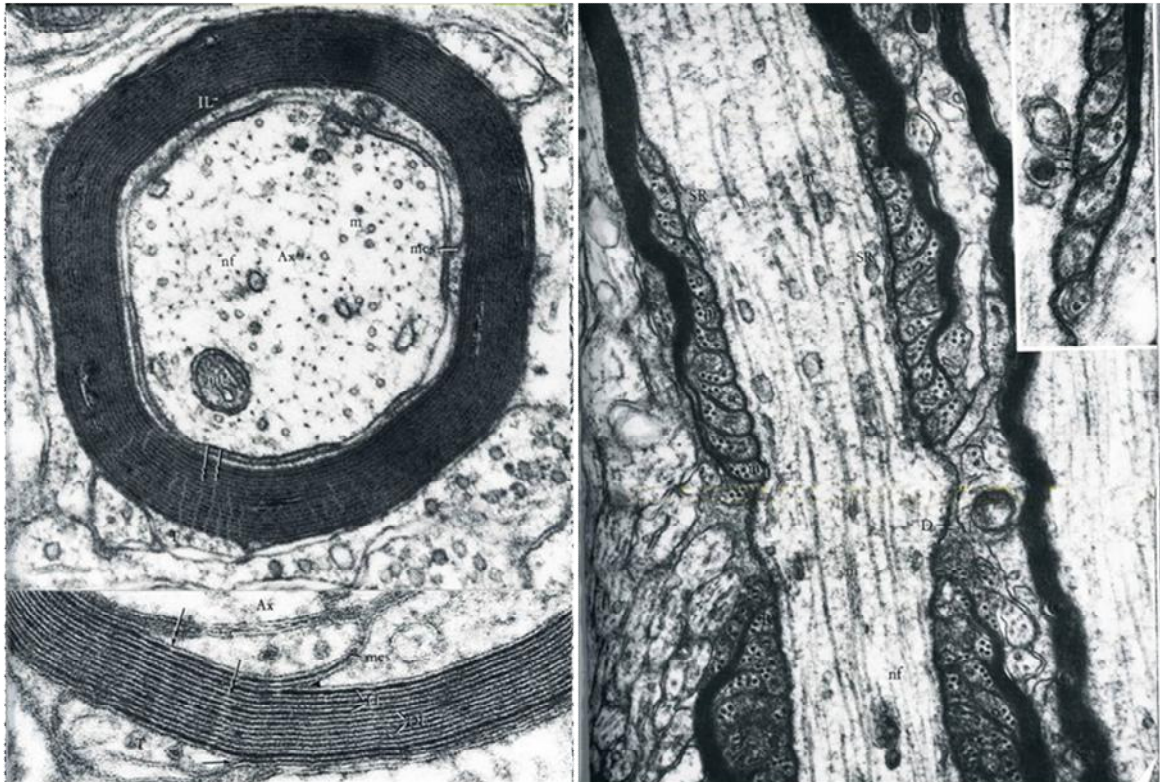
Los axones mielinizados conducen la señal nerviosa aproximadamente diez veces más rápido que los no mielinizados. Para conseguir la misma velocidad que un axón mielinizado, un axón no mielinizado debería ser cuarenta veces más grueso y emplear cinco mil veces más energía (Garbay y cols., 2000). Aparte del aumento de la velocidad de conducción, la mielina está también implicada en la regulación del transporte axonal (Edgar y cols., 2004), el mantenimiento de la integridad axonal y la composición iónica y en la regulación del volumen axonal

(Laule y cols., 2007). Los nodos en el SNP y SNC presentan características estructurales similares, aunque existen algunas notables diferencias. En los nervios periféricos mielinizados los axones están recubiertos por una lamina basal sintetizada por las células de Schwann mielinizantes. En el SNC no hay lámina basal y los nodos están en contacto con proyecciones astrocitarias.

Señales procedentes de las neuronas regulan la proliferación y la supervivencia glial, de tal forma que el número de células gliales depende de los axones que van a ser mielinizados (Barres y Raff, 1999). Varios factores de crecimiento, como PDGF-AA , FGF2 , IGF-1 , NT3, neuregulina-1 (NRG1) y CNTF, regulan el desarrollo de los OLs en (Barres y Raff, 1994). Los OLs en exceso mueren en una etapa inmadura de su diferenciación, controlando el número de OLs formadores de mielina.

El proceso de mielinización del axón por el oligodendrocito es similar al de la célula de Schwann. Sin embargo una oligodendrocito puede formar mielina en cada una de sus prolongaciones que se adhieren inicialmente a un axón, dando lugar hasta 50 segmentos axonales mielinizados, mientras que las células de Schwann mielinizan un solo segmento axónico y su soma está posicionado en el centro de ese segmento(Simons y Trajkovic, 2006).

Oligodendrocito mielinizante (SNC)



Célula de Schwann mielinizante (SNP)

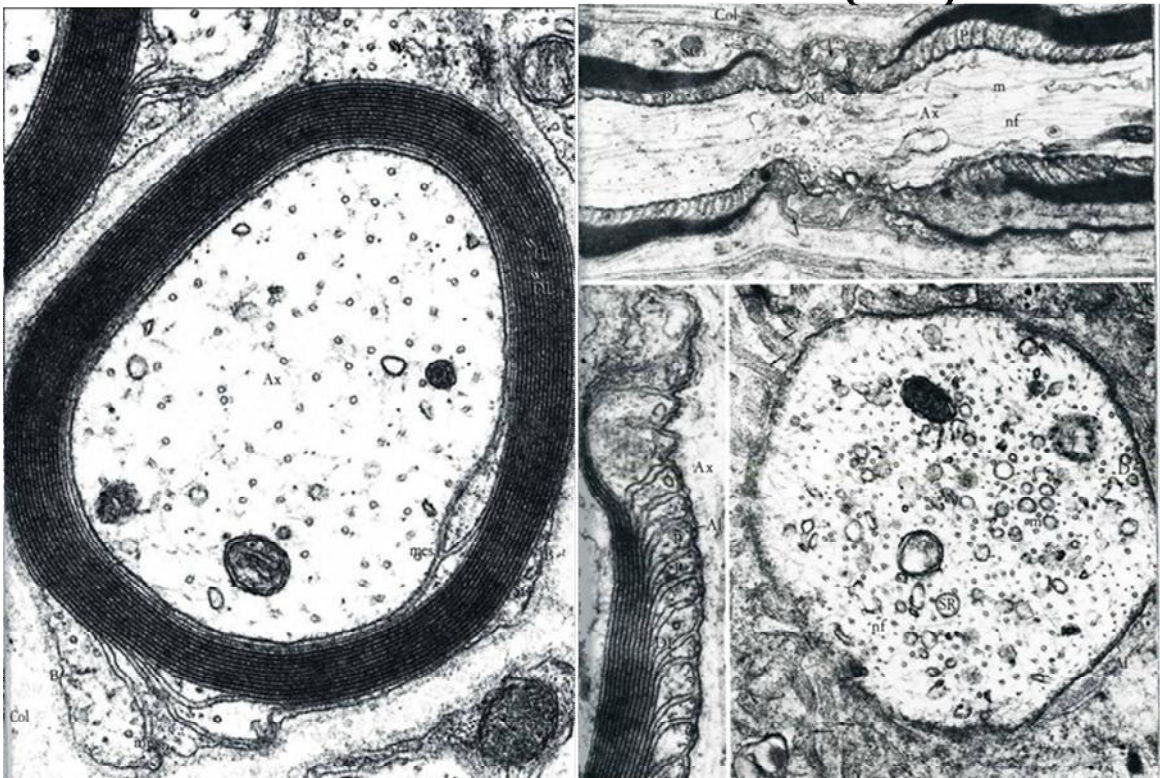


Figura 3. Imágenes al microscopio electrónico de mielina en el SNC y SNP
(Peters y cols., 1978).

3.2. Otras células con capacidad de mielinizar

3.2.1. Células de Schwann

Durante el desarrollo de los nervios periféricos, células de la cresta neural generan las células de Schwann inmaduras (Jessen y Mirsky, 2005). El destino postnatal de las células de Schwann inmaduras depende del diámetro del axón con el que se asocian. Las células que estén en contacto con un axón de gran calibre (a partir de 1-2 μm de diámetro) producirán mielina alrededor de éste en exclusiva, mientras que las que tomen contacto con axones más finos los envolverán formando haces o paquetes de fibras no mielinizadas. Un evento importante antes de la mielinización es la precisa disposición de las células a lo largo de los nervios. Inicialmente, las células de Schwann inmaduras rodean grupos de axones; las células individuales migran distalmente y empiezan a rodear los axones gruesos, adoptando una relación 1:1 con ellos. Este proceso, denominado clasificación radial, sólo puede ocurrir después de que las células de Schwann hayan iniciado la producción de una lámina basal, característica propia de ellas. La lámina basal sirve para establecer un eje de polaridad que define la orientación de la célula de Schwann con el medio ambiente extracelular y con la membrana axonal en el proceso de mielinización (Simons y Trotter, 2007) y en el caso de lesión del nervio sirve para contener las células de Schwann, formando tubos denominados "bandas de Büngner" por los que puede regenerar el axón y volver a ser mielinizado (Ramón y Cajal y *cols.*, 1905).

Estudios recientes sugieren que es la expresión de NRG1 de tipo III en la superficie axonal lo que induce la formación de mielina por las células de Schwann. Las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de ratones transgénicos que carecen de esta proteína no se mielinizan (Taveggia y *cols.*, 2005), mientras que la sobreexpresión de NRG1 de tipo III da lugar a una hipermielinización de axones, incluso de pequeño diámetro (Michailov y *cols.*, 2004). La NRG1 es también importante para la supervivencia y la proliferación de los precursores de las células de Schwann (Jessen y Mirsky, 2005) y, por lo tanto, es la que controla la cantidad de mielina requerida para el SNP en desarrollo.

3.2.2. Glía envolvente olfatoria

Las células de la glía envolvente olfatoria se localizan en el nervio olfatorio y penetran en el SNC. Estas células rodean los paquetes de axones recién formados de las neuronas sensoriales olfatorias en la periferia de la cintilla olfativa primaria y

cruzan una zona de transición entre el SNP y el SNC, para llegar al bulbo olfatorio, donde los axones establecen sinapsis funcionales con las neuronas centrales en el glomérulo olfativo (Doucette *y cols.*, 1983).

Las células de la glía envolvente olfatoria envuelven, acompañan y guían los axones desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo. Los axones de las neuronas sensoriales olfatorias, a diferencia de otros axones centrales, tienen la capacidad de extenderse hasta el interior del SNC tras una lesión o recambio natural (Schwob *y cols.*, 1999). No se ha identificado otro sitio en el SNC adulto donde exista un crecimiento a larga distancia de las fibras nerviosas con posterior restablecimiento de conexiones neuronales funcionales. Esto sugiere que la glía envolvente del sistema olfatorio tiene propiedades especiales que permiten el crecimiento axonal hacia el bulbo olfatorio.

Aunque las células de la glía envolvente olfatoria normalmente no producen mielina, varios estudios han mostrado que son capaces de mielinizar neuronas de ganglio dorsal en cocultivo (Doucette y Devon, 1995) y que tras su trasplante en el SNC podrían promover la mielinización en lesiones de médula espinal (Imaizumi *y cols.*, 1998; Radtke *y cols.*, 2004) y la remielinización en modelos de desmielinización (Coutts *y cols.*, 2013).

4. Enfermedades desmielinizantes

La desmielinización, es el proceso patológico en el que degeneran las vainas de mielina alrededor de los axones. Se pueden distinguir dos tipos de desmielinización. La desmielinización primaria, se refiere al proceso que daña directamente al OL y la desmielinización secundaria o degeneración Walleriana, que es consecuencia de un daño en el axón. La desmielinización primaria puede ser causada por una gran variedad de desórdenes inmunitarios, infecciosos, genéticos y metabólicos (Franklin y Ffrench-Constant, 2008). Referimos a continuación los tipos más comunes:

4.1. Tipos

4.1.1. Autoinmunes

La pérdida de la mielina puede estar asociada a una reacción inmune con neuroinflamación debida a que el organismo considera como ajenas algunas

moléculas de la membrana. Esta respuesta inmune aberrante puede tener su origen en factores genéticos y/o en infecciones previas.

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante más frecuente del SNC y una de las causas más comunes de incapacidad neurológica en adultos jóvenes. La enfermedad tiene una patogenia inmunológica en personas genéticamente susceptibles y se considera que los síntomas iniciales de la EM son el resultado de la desmielinización, que produce una ralentización o bloqueo de la conducción nerviosa. Ciertos factores, aún desconocidos, desencadenan la activación del sistema inmunológico con daño inflamatorio de glía y neuronas, seguidos por una recuperación de la función y reparación estructural, gliosis postinflamatoria y neurodegeneración. Esta secuencia de procesos implica un curso clínico caracterizado por episodios de recaídas (exacerbaciones o brotes) con recuperaciones o remisiones, seguidas en el tiempo por nuevos episodios que suelen dejar secuelas persistentes, y por un progreso de la discapacidad (Hickey, 1999).

La disfunción neurológica observada en la EM ha sido tradicionalmente atribuida a la desmielinización y la muerte del oligodendrocito, provocando de manera secundaria que los axones desmielinizados se vuelvan más vulnerables al daño durante la fase aguda, y al daño y a la atrofia durante la fase crónica, y ello desencadene la cronicidad en la enfermedad. Mientras que las causas de dicha atrofia axonal siguen siendo desconocidas, la desmielinización podría predisponer a los axones a un daño secundario por múltiples mecanismos de citotoxicidad, incluyendo disfunción de los canales iónicos y daño mitocondrial, o fallo de soporte neurotrófico de los oligodendrocitos mielinizantes, lo cual implicaría que una de las principales funciones de la mielina también sería la de proteger a los axones de un daño secundario (Rodríguez, 2003; Waxman, 2006).

4.1.2. Leucodistrofias

Las leucodistrofias son enfermedades de base genética en las que áreas de sustancia blanca carecen de mielina o están degeneradas. En unos casos, las leucodistrofias se producen cuando se ven alterados genes que codifican proteínas específicas del oligodendrocito, impidiendo la producción normal de mielina. Así ocurre en la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, causada por una mutación recesiva del gen que codifica para una proteína PLP1 en el brazo largo del cromosoma X (Southwood y cols., 2013) o el caso de la enfermedad de Krabbe,

que es causada por mutaciones en el gen GALC, localizado en el cromosoma 14, que provocan deficiencia de la enzima galactocerebrosidasa y, como consecuencia, la acumulación de lípidos no metabolizados afecta el crecimiento de la vaina de mielina, causando una afectación severa de las habilidades motoras.

En otros casos se produce degeneración secundaria de los OLs o de la mielina por una disfunción metabólica, como ocurre en la adrenoleucodistrofia, producida por un trastorno de la beta oxidación peroxisomal de ácidos grasos, lo cual provoca la acumulación de ácidos grasos de cadena larga en los tejidos de todo el cuerpo afectando, entre otras estructuras, la mielina. De manera similar, en la leucodistrofia metacromática está afectado el metabolismo de los esfingolípidos, produciéndose el daño en la mielina (Poeppel y cols., 2005; Berger y Gartner, 2006).

Aunque no hay cura para las leucodistrofias, en este último caso trasplantes de sangre del cordón umbilical antes de la aparición de síntomas han detenido con éxito la enfermedad y trasplantes tempranos de médula ósea también han demostrado mejorar la sintomatología (Sakai, 2009; Zizioli y cols., 2014).

5. Terapia celular sustitutiva

5.1. Células madre o troncales

En los últimos años ha existido un creciente interés por las células madre y su posible potencial terapéutico. Los resultados experimentales que se están obteniendo en este campo nos hacen pensar en una posible aplicación no muy lejana de estas técnicas para paliar determinadas enfermedades en el hombre. Las células madre embrionarias son pluripotentes, lo cual significa que tienen la capacidad de diferenciarse hacia cualquier tipo celular del cuerpo y se pueden propagar casi indefinidamente en cultivo. Sin embargo, debido a problemas éticos y legales para su utilización, en los últimos años se han empezado a utilizar como alternativa para futuras aplicaciones terapéuticas las células madre adultas, que parecen representar una opción muy prometedora y pueden, además, ser obtenidas del propio paciente si ello conviene.

Pueden obtenerse células madre adultas de distintos tejidos; por ejemplo, en el SNC adulto existen células madre multipotentes, que tienen capacidad de originar tanto neuronas como glía. Estas células realizan divisiones asimétricas de modo que una de las células hijas continúa proliferando hasta diferenciarse en una neurona o una célula glial y la otra permanece quiescente como célula madre. Estas

características de autorrenovación y multipotencialidad definen a las células madre de un órgano determinado (Gage y *cols.*, 1995)

Otra fuente de células madre adultas que ha despertado gran interés por las posibilidades que ofrece son las células mesenquimales. El patólogo Cohnheim observó por primera vez la presencia células madre no hematopoyéticas en la médula ósea en 1867. Él observó que eran células con morfología similar a fibroblastos que migraban y ayudaban a regenerar tejido en lugares donde se producían lesiones. El trabajo pionero de Friedenstein y colaboradores (Friedenstein y *cols.*, 1966) en la década de 1960 donde aislaron, cultivaron y diferenciaron estas células abrió un nuevo campo de investigación de células madre adultas. Casi 20 años después, Owen (Owen, 1988) y Caplan (Caplan, 1991), introdujeron el término de células madre mesenquimales del estroma de médula ósea (BMSC). A partir de ese momento, se encontraron múltiples nichos de células mesenquimales (por ejemplo, tejido adiposo, membrana sinovial, dermis, periostio, los dientes de leche, etc.) (da Silva Meirelles y *cols.*, 2006; Baer y Geiger, 2012).

Gran parte del trabajo llevado a cabo sobre las células madre adultas se ha realizado con BMSC. El uso clínico de las BMSC está limitado por los problemas de dolor durante su extracción y el bajo número de células obtenidas, lo que ha llevado a los investigadores a buscar fuentes alternativas de células mesenquimales. Las células estromales derivadas de tejido adiposo (ADSC) son un tipo de célula mesenquimal con gran parecido a las BMSC (derivan ambas del mesodermo embrionario), de muy fácil obtención en grandes cantidades (por ejemplo, mediante lipoaspirado), con gran capacidad proliferativa y multipotencialidad en cultivo, pudiendo dar lugar, de manera espontánea, a tejido adiposo, cartílago y hueso (Pittenger y *cols.*, 1999) y, de manera inducida, a músculo y a células con características de tipos celulares no procedentes de su lámina embrionaria, tales como células neurales, epiteliales o hepáticas (Zuk y *cols.*, 2001; Zuk y *cols.*, 2002; Kang y *cols.*, 2004; Rodríguez y *cols.*, 2005a; Rodríguez y *cols.*, 2005b; Melief y *cols.*, 2013).

No existe un marcador o combinación de marcadores que caracterice exclusivamente las células mesenquimales. Distintos trabajos han descrito que son positivas para CD105, CD73, CD90, CD146 y CD271, pero probablemente seleccionan de esta manera subpoblaciones de célula mesenquimal con unas características o propiedades peculiares. La identificación de un marcador definitivo podría permitir el aislamiento de las ADSC de tejido fresco con mayor precisión y rapidez. Se ha propuesto Stro-1, que es el marcador más conocido de ADSC, pero

no es exclusivo de estas células y su expresión se pierde en cultivo (da Silva Meirelles y cols., 2008; Braun y cols., 2013).

Además su multipotencialidad, que permite plantear su posible uso para terapias de sustitución celular, las células mesenquimales poseen unas propiedades accesorias que las hacen particularmente convenientes en el trasplante celular en terapias del sistema nervioso. Por una parte, las células mesenquimales pueden secretar factores tróficos que protegen y estimulan a las células nerviosas o favorecen la reparación del tejido nervioso, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Bae y cols., 2011), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (Tomita y cols., 2013), y el FGFb (Marconi y cols., 2013). Por otro lado, las células mesenquimales tienen propiedades inmunomoduladoras. En cultivo, las células madre mesenquimales (MSC) suprimen la proliferación de células T sometidas a estimulación alogénica o mitogénica (Di Nicola y cols., 2002; Marigo y Dazzi, 2011), inhiben la diferenciación y maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos (Nauta y cols., 2006; Djouad y cols., 2007) así como la proliferación de linfocitos B y NK (Corcione y cols., 2006; Sotiropoulou y cols., 2006) y promueven la generación de células T reguladoras (Aggarwal y Pittenger, 2005; Maccario y cols., 2005; Crop y cols., 2010).

Los trasplantes de estas células madre han mostrado resultados beneficiosos en la regulación de la respuesta inflamatoria y en la capacidad antioxidante en trastornos neurodegenerativos (Morita y cols., 2008; Uccelli y cols., 2012). Las ADSC se han utilizado, en humanos, en ensayos clínicos de esclerosis múltiple, polimiositis, dermatomiositis o artritis reumatoide. Varios ensayos clínicos que se están realizando en todo el mundo, están utilizando la terapia con células madre de tejido adiposo humano, y se está produciendo una rápida evolución y expansión de su número con resultados prometedores (Gir y cols., 2012; Chan y cols., 2014).

5.2. Diferenciación neural para la terapia celular

En las dos últimas décadas, múltiples equipos han investigado la diferenciación de las células madre embrionarias de roedores a neuronas capaces de sobrevivir y de diferenciarse *in vivo* (Deacon y cols., 1998; Brustle y cols., 1999; Lee y cols., 2000; Wichterle y cols., 2002). La generación de células gliales ha recibido mucha menos atención, pero en un trabajo publicado en 2005, Nistor y col. (Nistor y cols., 2005) consiguieron por primera vez la diferenciación de células madre embrionarias humanas hacia el linaje oligodendroglial con capacidad de

mielinizar *in vivo* y, con ello, una posible herramienta para el tratamiento de enfermedades humanas desmielinizantes mediante terapia celular.

No obstante, la obtención de células embrionarias para este fin presenta barreras logísticas y éticas. Por ello, se buscaron fuentes alternativas de células que pudieran ser diferenciadas a células neurales salvando estas barreras. Las células donantes deberían ser: fácilmente disponibles, capaces expandirse rápidamente, de sobrevivir un plazo largo de tiempo y de integrarse en el cerebro (McKay, 1997). Las células mesenquimales cumplían varios de esos requisitos pues, además, eran multipotentes, producían sustancias tróficas para las células nerviosas y eran capaces de modular la inflamación, inhibiendo dos de las citoquinas proinflamatorias más importantes (TNF α e IFN- γ), con lo cual incluso tenían la capacidad de reducir las complicaciones de rechazo de los alotrasplantes (Di Nicola y cols., 2002; Aggarwal y Pittenger, 2005).

5.2.1. Transdiferenciación neural

En 1997, Eglitis y Mezey (Eglitis y Mezey, 1997) mostraron que células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea de ratón macho, trasplantadas intravenosamente en ratones hembra (por lo cual se podían identificar con sondas para los cromosomas X o Y) migraban rápidamente y se integraban en el SNC. Las células trasplantadas eran más abundantes en aquellas zonas del parénquima nervioso donde existía mayor vascularización y daban lugar a células que exhibían marcadores astrogiales. El número de células derivadas de la médula ósea en el cerebro aumentaban con el tiempo, por lo que argumentaron que eran capaces de generar progenitores neurales que migraban en el cerebro. Un año más tarde, Azizi y cols. (Azizi y cols., 1998) mostraron que también las BMSC, tras su inyección directa en ganglios basales de rata, se integraban y migraban en el tejido huésped, siguiendo rutas migratorias similares a las células madre neurales. A los 72 días del trasplante, los autores afirmaban que las células eran viables y que no existían signos de respuesta inflamatoria o rechazo. Más aún, sugerían que cuando las BMSC se encontraban en la región periventricular de ratas jóvenes, éstas se diferenciaban en astrocitos y en neuronas. Sin embargo, estos resultados plantean muchas dudas ya que el colorante que utilizaron para marcar las células trasplantadas era bis-benzimida, que tiñe el DNA con altísima eficiencia, pero puede ser expulsado de las células y captado por las células del huésped.

La capacidad de las células mesenquimales para diferenciarse *in vitro* hacia la línea neural fue propuesta inicialmente por Woodbury y cols (Woodbury y cols., 2000). Estos autores proponían un protocolo para inducir el fenotipo neuronal en BMSCs humanas y de rata, que consistía en sustituir el medio de cultivo con suero el que estaban creciendo por un medio libre de suero con β -mercaptoetanol y butil hidroxianisol (BHA). Los cambios morfológicos eran evidentes en las primeras 3 horas. Sánchez-Ramos y cols. (Sanchez-Ramos y cols., 2000; Cai y cols., 2004), ese mismo año, propusieron una combinación diferente con la que afirmaban también que conseguían una transdiferenciación neural de BMSCs. En este caso, el tratamiento con ácido retinoico (RA) y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) o el cocultivo con células de mesencéfalo durante 2 semanas incrementaban la expresión de algunos marcadores neurales como nestina, GFAP o NeuN. Ambos aseguraban que las BMSC, tras ser expandidas en cultivo durante más de 20 pases como células indiferenciadas, podían ser inducidas a exhibir un fenotipo neural. Sin embargo, ni el fenotipo ni la morfología de las células era completamente nervioso. Posteriormente múltiples grupos de investigación han publicado que la aplicación de diversos "tratamientos inductores", que pueden contener hormonas (insulina, hidrocortisona, dexametasona), factores tróficos/citoquinas (neurotrofinas, FGFs), antioxidantes (hidroxianisol butilado), morfógenos (SHH, dibutilil cAMP..) y/o diversas moléculas de efecto no definido (forskolina, ácido valproico, β -mercaptoetanol, IBMX, indometacina, DMSO, etanol, etc..) sobre las células mesenquimales produce células con características neurales (Safford y cols., 2002; Safford y cols., 2004; Rivera y cols., 2008; Luo y cols., 2010; Kaka y cols., 2012) Otros autores observaron que las ADSC tratadas con una mezcla de factores de crecimiento gliales adoptaban una morfología ahusada similar a la de las células de Schwann. Las células tratadas expresaron los marcadores gliales, GFAP, S100 y p75, lo cual consideraron un indicador de su diferenciación. Cuando se cocultivaron con células similares a neuronas motoras, las células mesenquimales diferenciadas estimulaban el crecimiento de las neuritas, de manera similar a como lo harían las células de Schwann (Kingham y cols., 2007; Xu y cols., 2008), si bien las propias células mesenquimales también poseen esas propiedades neurotróficas, como hemos mencionado antes.

No obstante, observaciones propias y de otros grupos de investigación muestran que múltiples moléculas que se han considerado marcadores neurales se expresan de manera espontánea en las células mesenquimales en condiciones de cultivo sin que ello signifique que esas células puedan funcionar como neuronas o glía (Lu y cols., 2004; Paino CL, 2005; Deng y cols., 2006; Lamoury y cols., 2006; Timper y cols., 2006; Velloso y cols., 2011; Velloso y cols., 2013).

5.2.2. Transdiferenciación neural por reprogramación directa

La reprogramación celular se refiere a la conversión de un tipo de célula a otro mediante la alteración de sus marcas epigenéticas (Zhou y Melton, 2008). Esto se puede lograr por tres métodos diferentes: por transferencia nuclear de células somáticas, por fusión celular y mediante sobreexpresión de factores de transcripción propios del tipo celular que se quiere obtener. En el año 2006, un grupo de investigación liderado por Shinya Yamanaka logró reprogramar células somáticas a un estado similar al embrionario mediante la sobreexpresión de los factores de transcripción Oct3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4, propios de las células madre embrionarias. Cambiar referencia para poner Takahashi y Yamanaka 2006 (Takahashi y Yamanaka, 2006)

Las nuevas células madre se llamaron células madre pluripotentes inducidas (iPS). Desde entonces, la reprogramación celular ha supuesto una auténtica revolución en la biología celular y en la medicina regenerativa y se ha producido una rápida evolución y mejora de la metodología utilizada para la reprogramación celular.

Las células iPS presentan características similares a las células madre embrionarias en cuanto a su auto-regeneración y pluripotencialidad, lo que las sitúa como unas fuertes candidatas en terapias regenerativas, sin los problemas éticos y de disponibilidad los que presentan las células embrionarias. Sin embargo, las células iPS plantean sus propias limitaciones debido a los potenciales efectos mutagénicos desconocidas e imprevisibles que podría producirse por la sobreexpresión de estos genes. Múltiples grupos de investigación han orientado sus esfuerzos al desarrollo de métodos alternativos más seguros que no supongan un potencial riesgo para los futuros pacientes.

Se han desarrollado toda una colección de procedimientos para obtener prácticamente cualquier tipo celular a partir de células iPS con la finalidad de estudiar su biología del desarrollo, para estudiar las relaciones celulares *in vitro* o incluso establecer modelos personalizados de patologías cultivo, para *screening* farmacológico o para posible terapia celular. Sin embargo, los procedimientos, aún, son largos y complejos. Alternativamente, se han propuesto métodos para la obtención del tipo celular deseado mediante reprogramación celular directa, es decir, sin tener que revertir la célula a una fase de pluripotencialidad y rediferenciarla posteriormente al fenotipo deseado. Así se han obtenido mediante reprogramación directa progenitores sanguíneos (Szabo y cols., 2010),

cardiomiocitos(Ieda y *cols.*, 2010), o neuronas funcionales (Vierbuchen y *cols.*, 2010; Caiazzo y *cols.*, 2011; Pfisterer y *cols.*, 2011).

Se han identificado varios factores de transcripción específicos que coordinan la diferenciación del OL. Los factores de transcripción de la familia Olig (Olig1 y Olig2) juegan un papel clave en la regulación del desarrollo del OL. La expresión de Olig2 induce a la expresión de otros factores de transcripción, como la proteína homeobox NKX2.2 (Zhou y *cols.*, 2001), que está implicada en la morfogénesis del SNC, expresándose, como el Olig2, en motoneuronas y progenitores de oligodendrocitos. Olig2 además induce la expresión del factor de transcripción Sox10 que coopera con Olig1 y es necesario para la diferenciación terminal de OLs(Li y *cols.*, 2007). El Sox10 es uno de los factores de transcripción centrales del linaje oligodendroglial (Wang y *cols.*, 2014). Los promotores de una gran variedad de genes implicados en la mielinización tienen al menos una secuencia de unión de los factores de transcripción SoxE (Sox8, Sox9 y Sox10) y se ha demostrado que el Sox9 determina el destino glial de los progenitores neurales en la médula espinal durante el desarrollo (Stolt y *cols.*, 2003). Estudios adicionales han identificado varias proteínas ZFPs (*zinc finger proteins*) necesarias para la diferenciación oligodendroglial. Entre estos, el Zfp191 participa en el proceso de mielinización de los OLs (Howng y *cols.*, 2010), el ZFP conocido como Yin Yang 1 (YY1) regula la diferenciación de PCOs hacia OLs maduros (He y *cols.*, 2007) y el Zfp488, regula la formación de PCOs y la diferenciación PCOs en OLs maduros junto con el Olig2(Wang y *cols.*, 2006).

Recientemente, dos grupos han demostrado simultáneamente que se pueden obtener PCOs mediante reprogramación directa a partir de fibroblastos de ratón. El grupo de Paul J. Tesar(Najm y *cols.*, 2013), basándose en estudios de microarrays realizados por ellos mismo (Najm y *cols.*, 2011) y por el grupo de Ben A. Barres(Cahoy y *cols.*, 2008), optaron por sobreexpresar un conjunto de ocho factores de transcripción de manera individualizada y en posibles combinación, utilizando la proteína fluorescente verde, eGFP, bajo el promotor de PLP1 como reportero de la transdiferenciación. Así, observaron que la combinación Sox10, Olig2 y Nkx6.2 era la más eficiente para generar células que expresaban PLP1. Por su parte, el grupo de Marius Wernig (Yang y *cols.*, 2013) realizó experimentos con 10 factores de transcripción diferentes de manera individualizada donde observaron que el Sox10 era suficiente para la activación de la expresión de PLP1 y que el conjunto de factores más eficiente era la combinación Sox10, Olig2 y Zfp536. En

ambos casos, las células generadas por reprogramación celular directa no sólo expresaban características moleculares de OLs, sino que demostraron su capacidad para mielinizar axones tanto en cultivo como tras su trasplante en áreas desmielinizadas del SNC, con lo que se demostró que eran auténticos OLs, indistinguibles de los que se obtienen a partir de células neurales.

Sox10 y Olig2 parecen representar el denominador común para el proceso de conversión. El papel clave de Sox10 y Olig2 no es inesperado ya que estudios previos habían demostrado la importancia de estos factores de transcripción para el desarrollo oligodendroglial y para la formación de la mielina durante el desarrollo embrionario y postnatal (Zhou *y cols.*, 2001; Lu *y cols.*, 2002; Stolt *y cols.*, 2002; Hornig *y cols.*, 2013).

Partiendo de estas premisas, en el presente trabajo hemos utilizado los plásmidos que sobreexpresan los factores de transcripción Sox10, Olig2, Zfp536 y Nkx6.2, producidos por el laboratorio de Marius Wernig (Yang *y cols.*, 2013) para transdiferenciar las células ADSC adultas hacia oligodendrocitos mediante reprogramación celular directa.

Hipótesis y Objetivos

Como hipótesis de trabajo proponemos:

“Se pueden obtener oligodendrocitos funcionales a partir de ADSC de rata en cultivo”

Para demostrar esta hipótesis nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la expresión de marcadores oligodendrogiales en las ADSC en cultivo en condiciones basales y con tratamientos farmacológicos.
2. Seleccionar los factores de transcripción necesarios para reprogramar las ADSCs de rata a precursores de oligodendrocitos.
3. Establecer un procedimiento eficiente de transdiferenciación de las células ADSC de rata para su conversión a precursores de oligodendrocitos.
4. Comprobar la funcionalidad de los oligodendrocitos generados, probando su capacidad de mielinización de axones en cultivo.

Material y Métodos

1. Materiales y reactivos

1.1. Anticuerpos

Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Referencia	Dilución IF	Dilución WB
A2B5	Mouse	Sobrenadante hibridoma, clon 105	(Eisenbarth y cols., 1979)	1/10	
anti-Actina	Ratón	Sigma-Aldrich	A2547		1/20000
anti-CNPasa	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-30158	1/100	1/500
anti-Cx47	Conejo	Donado por Orthmann-Murphy	(Orthmann-Murphy y cols., 2007)	1/1000	1/2500
anti-GFAP	Ratón	Chemicon, clon GA5	MAB360	1/500	1/200
Anti-GFAP	Conejo	DakoCytomation	Z0334	1/500	
Anti-GFP	Pollo	Rockland	600-901-215S	1/500	
anti-galactocerebroside (O1)	Ratón	Sobrenadante hibridoma, clon O1	(Chandler y cols., 1984)	1/5 - 1/10	
anti-Nestina	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	N-5413	1/300	
anti-condroitin sulfato proteoglicano 4 (NG2)	Conejo	Chemicon - Millipore	AB 5320	1/1500	
anti-condroitin sulfato proteoglicano 4 (NG2)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-20162	1/100	
anti-MAG	Ratón	Sobrenadante hibridoma, clon 513	(Poltorak y cols., 1987)	1/10	
anti-MBP	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	Sc-58543	1/200	1/100

anti-MBP	Pollo	EnCor Biotechnology	ABIN1842221	1/1000	1/10000
anti-MBP	Rata	Abcam	Ab7349	1/20	1/500
anti-MOG	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-73330	1/100	1/200
anti-Olig2	Conejo	Chemicon-Millipore	AB9610	1/500	1/2500
anti-Olig2	Ratón	Chemicon-Millipore	MABN50	1/100	1/2500
anti-OPS/Claudin-11	Conejo	LifeTechnologies	36-4500	1/50	1/250
anti-P0	Ratón	Anticuerpo P07, clon 18	Donado por J. Archelos	1/250	1/1000
anti-p75NTR	Ratón	Sobrenadante hibridoma, clon 192	(Chandler y cols., 1984)	1/10	
Anti-PSA-NCAM	Ratón	Chemicon	MAB5324	1/10	
anti-Sox10	Conejo	Chemican	AB5727	1/25	1/150
anti-Sox10	Ratón	R&B Systems	MAB2864	1/100	
Anti-sulfátido y psicossina (O4)	Ratón	Sobrenadante hibridoma, clon O4	(Chandler y cols., 1984)	1/10	
anti-β-Tubulina III	Conejo	Covance, clon TUJ1	PRB-435P	1/500	1/1000
anti-β-Tubulina III	Ratón	Sigma-Aldrich, clon SDL3D10	T8860	1/200	1/1000
anti-GAPDH	Pollo	Millipore	AB2302		1/5000
Anti-conejo Cy5 (ECL Plex)	Cabra	GE Healthcare	PA45011V		1/2500
Anti-conejo IgG PO		GE Healthcare	RPN2106		1/2000
Anti-conejo IrDye 680	Cabra	LI-COR Biosciences	926-680LT	1/500	

Anti-conejo IgG Alexa Fluor 488	Cabra	Molecular probes, LifeTechnologies	A11034	1/500	
Anti-Mouse IgM Microbeads	Cabra	MACS Miltenyi Biotec	130-047-302	1/5	
Anti-pollo DyLight 488	Cabra	Rockand	603-141-126	1/500	1/10000
Anti-pollo IRDye 700DX	Cabra	Rockand	603-130-126	1/500	1/10000
Anti-pollo PO	Cabra	Rockand	603-103-126		1/10000
Anti-ratón IgG Alexa Fluor 586	Cabra	Molecular probes, LifeTechnologies	A11031	1/500	
Anti-ratón Cy3 (ECL Plex)	Cabra	GE Healthcare	PA43009V		1/2500
Anti-ratón IgG PO		GE Healthcare	RPN2106		1/2000
Anti-conejo IrDye 800	Cabra	LI-COR Biosciences	926-32211	1/500	1/10000
Anti-ratón IrDye 680	Cabra	LI-COR Biosciences	926-68020	1/500	1/10000
Anti-rata IgG Rodamina	cabra	Jackson	112-025-143	1/100	

1.2. Enzimas para la construcción plasmídica

Enzimas	Secuencia	Casa comercial
ApaI	G/TGCAC	New England Biolabs
BamHI	G/GATCC	Roche
BglII	A/GATCT	Roche
Bsp1407I	T/GTACA	Fermentas
Bsu36I	CC/TNAGG	New England Biolabs
EcoRI	G/AATTC	Roche
HindIII	A/AGCTT	Invitrogen
KpnI	G/GTACC	Roche
NheI	G/CTAGC	Fermentas
NotI	GC/GGCCGC	Roche
PstI	C/TGCAG	New England Biolabs
SalI	G/TCGAC	Roche
SmaI	CCC/GGG	New England Biolabs
Tth111I	GACN/NNGTC	New England Biolabs
T4 DNA Ligase		New England Biolabs
XhoI	C/TCGAG	Roche

1.3. Plásmidos para la reprogramación directa

Plásmidos	Origen
FUW-M2rtTA	Addgene
gfaABC1D-lacZ	Cedido por Michel Brenner (University of Alabama,

	Birmingham)
LeGO-C	Lentiviral Gene Ontology Vectors
LeGO-G	Lentiviral Gene Ontology Vectors
1323MBP-Luc	Cedido por Robin Miskimins (University of South Dakota)
psPAX2	Addgene
Tet-O-FUW-EGFP	Addgene
Tet-O-FUW-Nkx6.1	Addgene
Tet-O-FUW-Olig2	Addgene
Tet-O-FUW-Sox10	Addgene
Tet-O-FUW-Zfp536	Addgene
VSV-G	Cedido por Daniel González (CTB Madrid)

1.4. Reactivos para cultivos celulares

Reactivos	Casa comercial
Accutase	Life Technologies
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sal disódica	Sigma-Aldrich
Ácido retinoico <i>all trans</i> (RA)	Sigma-Aldrich
Aminoácidos no esenciales MEM (100X)	Sigma-Aldrich
Antibiótico/antimicótico	Fisher Scientific
<i>Basic fibroblast growth factor</i> , bFGF	PeptoTech
<i>Benztropine mesylate</i>	Santa Cruz Biotechnology
Biotina	Sigma-Aldrich
Tetraborato sódico	MERCK
Colagenasa A	Roche
<i>Dibutyryl cAMP</i> (dbcAMP, bucladesina)	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's minimal essential medium</i> (DMEM)	Gibco
Doxiciclina	Fisher Scientific
<i>Epidermal growth factor</i> (EGF)	PeptoTech
D-(+)- Glucosa	Sigma-Aldrich
Fluorodeoxiuridina	Sigma-Aldrich

<i>Hanks' balanced salt solution</i>	Sigma-Aldrich
Hormona triyodotironina, T3	Sigma-Aldrich
Laminina	Sigma-Aldrich
<i>Leibovitz's L15</i>	PAA
L-glutamina	Fisher Scientific
<i>Lipofectamine 2000</i>	Invitrogen
Matrigel	Sigma-Aldrich
<i>MesenPRO kit (MesenPRO RS™ Basal Medium and MesenPRO RS™ Growth Supplement)</i>	Gibco, Invitrogen
<i>Minimum essential medium eagle, alpha modif. (αMEN)</i>	Sigma-Aldrich
<i>Neurobasal Medium</i>	Gibco, Invitrogen
Neurotrofina-3 (NT3)	PeptideTech
β-NGF	PeptideTech
Poly-L-ornitina	Sigma-Aldrich
Optimem	Gibco, Invitrogen
Piruvato sódico	Gibco, Invitrogen
<i>Platelet derived growth factor (PDGF-BB)</i>	Isokine/Cells GS
<i>Platelet derived growth factor (PDGF-AA)</i>	PeptideTech, ImmunoTools
Suero fetal bovino	Gibco, Invitrogen
Suplemento B27	Gibco, Invitrogen
Tripsina	Sigma-Aldrich
Zeozin	Alfa Aesar

1.5. Reactivos para inmunocitoquímica

Reactivos	Casa comercial
Ácido acético glacial	PANREAC
bisBenzimida HOE33342 Trihidrocloruro, Hoechst	Sigma-Aldrich
Etanol	VWR International
Hoechst 33342 (bisbenzimidaz)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehído	Merck
PBS (pastillas)	Gibco, Invitrogen

Prolong Gold antifade reagent	Invitrogen
Suero normal de cabra	PAA
<i>Triton™ X100</i>	Sigma-Aldrich

1.6. Reactivos para la producción de Lentivirus

Reactivos	Casa comercial
Agar	Conda/Pronadisa
Ampicilina	Serva
Bacto extracto de levadura	Becton-Dickinson
Bacto Triptona	Becton-Dickinson
Cloraquina	Sigma-Aldrich
Cloruro cálcico (CaCl_2)	MERCK
Cloruro de hexaaminocobalto (NH_4Cl)	Sigma-Aldrich
Cloruro de magnesio (MgCl_2)	Sigma-Aldrich
Cloruro de manganesio (MnCl_2)	Sigma-Aldrich
Cloruro potásico (KCl)	Quimipur
Cloruro sódico (NaCl)	MERCK
Difco Gelatina	Becton-Dickinson
Polibreno	Sigma-Aldrich
Sal sódica Mes	Sigma-Aldrich

1.7. Reactivos para RT-PCR

Reactivos	Casa comercial
Agarosa	Seakem
ADN polimerasa LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche
ADN polimerasa y 10X PCR Buffer	Applied Biosystems
<i>AmpliTaq DNA Polymerase</i>	Life Technologies
Buffer de carga 6x	Fermentas

DNA molecular weight marker III, V, VIII	Roche
dNTPs	Roche
Gelstar Nucleic Acid gel stain	Lonza
6X Trirack™ DNA loading Dye	Fermentas
Trizma base	Sigma-Aldrich

1.8. Reactivos para el test de multipotencialidad de las células mesenquimales

Reactivos	Casa comercial
Ácido acético glacial	MERCK
Ácido ascórbico-2-fosfato	Sigma-Aldrich
Alcian Blue	BDH
Aceite rojo O	Sigma-Aldrich
Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)	Gibco, Invitrogen
Etanol	PROLABO
Dexametasona	Sigma-Aldrich
β-glicerofosfato	Calbiochem
Indometacina	Sigma-Aldrich
Insulina	Gibco, Invitrogen
3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX)	Gibco, Invitrogen
Isopropanol	MERCK
Rojo de alizarina S	Sigma-Aldrich
TGF-β1	PeptoTech

1.9. Reactivos para western blot

Reactivos	Casa comercial
Acrilamina/Bisacrilamida	BIO-RAD
Azul de bromofenol	MERCK
Cóctel inhibidor de proteasas (Leptina y Atropina)	Calbiochen
Ditiotreitol (DTT)	Life Technologies

Fluoruro de fenilmetanosulfonil (PMSF)	Sigma-Aldrich
Glicerol	Sigma-Aldrich
Glicina	Sigma-Aldrich
Medio de bloqueo	GE Healthcare
Membranas de nitrocelulosa	Amersham - GE Healthcare
Metanol	MERCK
NaF	MERCK
N-N'-N'-tetrametilen-diamina (TEMED)	BIO-RAD
Ortovanadato sódico	Sigma-Aldrich
PBS (pastillas)	Gibco, Invitrogen
Persulfato amónico	Sigma-Aldrich
SDS	MERCK
Tris-HCl	MERCK
Trizma base	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
β -mercaptoetanol	Panreac

1.10. Primers

Primers	Secuencia	Bandas
Para PCR		
CNPasa	FW: 5'-TCCGAGGAGTACAAGCGTCT- 3' RV: : 5' -ACAGCTGCCATTGGTTCTTC- 3'	217 bp
MBP	FW: 5'- TCCTTGA CTCCATCGGGCGCT-3' RV: 5'-GGAGATCCAGAGCGGCTGTCT-3'	Reconoce 5 isoformas con amplicones de 424 bp, 382 bp, 337 bp, 349 bp y 259 bp
MOG	FW: 5'-TGCAGCCAGAGGGCCTTAGCTT-3' RV: 5'-ATTCAGGCGCTTGCTCTGCGT-3'	341 bp con péptido señal 261 bp sin péptido señal
Olig2	FW: 5'-GCAGCGAGCACCTCAAATCGAA-3' RV: 5'-AAGATCATCGGGTTCTGGCGACGA-3'	143 bp
PLP1/DM20	FW: 5'-GGCCGAGGGCTTCTACACCAC-3' RV: 5'-CAGGAGCCCACTGTGGAGCAA-3'	PLP1 amplicón de 792 bp y DM20 amplicón de 687 bp
Sox-2	FW: 5'-TAAGTACACGCTTCCCGGAGGCTT-3' RV:5'-CGTTCATGTGCGCGTAGCTGT-3'	125 bp
Sox-10	FW: 5'-CCAGGCTCACTACAAGAGTGC-3' RV: 5'-CCTGTGGTCTCTGTCTTCACC-3'	424 bp
Micoplasma	FW: 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3' RV:5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	Reconoce amplicones desde 268 a 276 bp, según la especie de micoplasma
Para Clonación		
K-Ras end	FW:5'-GTACAAGAAGAAGAAGTCAAAGACAAAGTGTGTAATTATGTAAG-3' RV: 5'-AATTCTTACATAATTACACACTTTGTCTTTGACTTCTTCTTCTT-3'	
gfaABC1D-lacZ	FW:5'-GTAGGTTTGGCAAGCTAGCTAACATATCCTGGTGTGGA3' RV: 5'-GTACCACCACACTGGATCCTGAGACTGGGGAATT3'	
Para Secuenciación		
K-Ras end	5'- GGCATTAAAGCAGCGTATCCA-3'	
hGFAPp-LeGO G	5'- ACGAGATTCCAGCAGGTCG-3'	
rMBP-LeGO C	FW: 5'-ACGAGATTCCAGCAGGTCG-3' RV: 5'-GCCTTGGAGCCGTACATGA-3'	

2. Animales utilizados

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley criadas en el estabulario del Hospital Ramón y Cajal, bajo supervisión veterinaria. Los estudios contaban con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal del hospital y se realizaron de acuerdo a la legislación vigente en materia de utilización de animales con fines experimentales (RD 1201/2005 y Directiva 2010/63 UE)

Las ADSC se obtuvieron de ratas macho de dos meses de edad, con un peso aproximado de unos 250 gr.

Los ganglios de las raíces dorsales se obtuvieron de fetos de rata de 17 días (E17), siendo día 1 el de la verificación de plug vaginal de esperma en la rata madre.

3. Medios de cultivo

A continuación se indican los medios empleados para la realización del trabajo:

α20: Medio de mantenimiento de células mesenquimales de rata	
αMEM (Minimal Essential Medium, alpha modification)	78%
FBS	20%
Antibiótico/Antimicótico	1%
Aminoácidos no esenciales	1%
MesenPRO: Medio de mantenimiento de células mesenquimales de humanas	
MesenPro medium	96%
MesenPro Growth Supplement	2%
Antibiótico/Antimicótico	1%
L-Glutamina	1%
D10: Medio de mantenimiento 293T y Medio utilizados para el test de multipotencialidad	
DMEM	88%

FBS	10%
Antibiótico/Antimicótico	1%
L-Glutamina	1%
NBB27: Medio definido	
Neurobasal	96%
Suplemento B27	2%
Antibiótico/Antimicótico	1%
L-Glutamina	1%
Medio de mantenimiento de las neuronas del ganglio dorsal	
Neurobasal	96%
Suplemento B27	2%
Antibiótico/Antimicótico	1%
L-Glutamina	1%
β -NGF	50 ng/ml
Medio mantenimiento de células reprogramadas	
Neurobasal	96%
Suplemento B27	2%
Antibiótico/Antimicótico	1%
L-Glutamina	1%
EGF	20ng/ml
bFGF	20ng/ml
BIOTINA	10ng/ml
PDGF-BB, PDGF-AA	10ng/ml
Doxiciclina	1mg/ml
Medio mantenimiento del co-cultivo de las células reprogramadas con neuronas de ganglio dorsal	

Neurobasal	96%
Suplemento B27	2%
Antibiótico/Antimicótico	1%
L-Glutamina	1%
BIOTINA	10ng/ml
Doxiciclina	1mg/ml
β -NGF (primera semana)	50 ng/ml

4. Cultivos celulares

4.1. Células mesenquimales de rata

Las ADSC de rata se obtuvieron de panículo adiposo inguinal en condiciones estériles mediante digestión con colagenasa A (1 mg/ml, 40 min a 37° C), disgregación del tejido y siembra sobre frasco de cultivo de plástico. Se seleccionaron las células mesenquimales en base a su adherencia a la superficie de plástico, y a su proliferación. Se realizaron pases cada semana mediante tripsinización y resiembra de 666 cél/cm², con un cambio de medio al 4º día. Los experimentos se realizaron con células que se encontraban entre el pase 1º y 4º. El medio de cultivo, denominado por nosotros α 20, consiste en medio base α -MEM, suplementado con 20% de suero fetal bovino (de un lote seleccionado por nosotros*), aminoácidos no esenciales y antibiótico/antimicótico.

**Nota: Los cultivos de ADSC son altamente dependientes de la calidad (origen), lote y frescura del suero, ya que pueden obtenerse resultados muy variables en cuanto a tipo celular, velocidad de proliferación, diferenciación espontánea y senescencia celular temprana con distintos sueros. Ello depende de factores (citoquinas, hormonas, proteínas, lípidos..) que no han sido aún definidos y que están presentes en cantidades variables en los distintos tipos de sueros y van degradándose conforme se acerca la fecha de caducidad del producto. Sin embargo, no hemos podido evitar nuestra dependencia del suero ya que, tras probar varios medios semi-definidos específicos para cultivo de células mesenquimales humanas, ninguno de ellos mantenía las ADSC de rata en proliferación desdiferenciada durante más de 2 semanas. El lote de suero fetal bovino utilizado, fue seleccionado en base al número de pases que se podían realizar con él sin que las células se diferenciaran, manteniendo una tasa de proliferación de, al menos, 30x por semana.*

4.2. Células mesenquimales humanas

Las ADSC humanas se obtuvieron de panículo adiposo inguinal sobrante en procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de varices venosas. Fragmentos de tejido se dispersaron en condiciones estériles mediante digestión con colagenasa A (1 mg/ml, 40 min a 37° C), disgregación mecánica y siembra sobre frasco de cultivo de plástico. Se seleccionaron las células mesenquimales en base a su adherencia a la superficie de plástico, y a su proliferación. Se realizaron pases cada semana mediante tripsinización y resiembra de 666 cél/cm², con un cambio de medio al 4º día. Las células se mantuvieron en el medio MesenPro (*MesenPRO* RS™ Medium - Life Technologies) con L-glutamina y antibiótico/antimicótico.

4.3. HEK 293T

Para la producción de lentivirus se utilizó la línea celular HEK 293T en medio D10. Antes de su utilización comprobamos que las células utilizadas estuvieran libres de micoplasma mediante PCR siguiendo el protocolo descrito por John R Masters et al. (Young y cols., 2010).

5. Test de multipotencialidad

Las células estromales de tejido adiposo, ADSC, son un tipo de célula mesenquimal con gran capacidad proliferativa y multipotencialidad en cultivo, pudiendo dar lugar, de manera espontánea, a tejido adiposo, cartílago, hueso y músculo (Pittenger y cols., 1999). El test de multipotencialidad es una prueba rutinaria de diferenciación de las células hacia 3 de estos fenotipos con el fin de demostrar que partimos de células mesenquimales.

Se testó la multipotencialidad de las células cultivadas, como prueba de que se trataba de células madre mesenquimales de tejido adiposo. Para ello, se indujo la diferenciación de estas células a adipocitos, condrocitos u osteocitos, utilizando medio D10 suplementado con un cóctel inductor específico. La diferenciación adipogénica se consiguió mediante el cultivo en rADSC y hADSC con un cóctel que contenía 10 mg/ml de insulina, 1 mM de dexametasona, 200 µM indometacina y

250 μ M de 3-isobutil-metil xantina (IBMX). La diferenciación condrogénica se obtuvo mediante un cóctel de 150 nM de ácido ascórbico-2-fosfato, 10 ng/ml de TGF- β 1, insulina 10 mg/ml y 100 nM de dexametasona. Para la diferenciación osteogénica, el medio basal se suplementó con 10 ng/ml de BMP-2, 100 nM de dexametasona, 50 mM de ácido ascórbico-2-fosfato y 10 mM de β -glicerofosfato. Al día 14 de incubación, en el caso de la diferenciación adipogénica, en la presencia de medios de diferenciación, las ADSCs fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y se tiñeron con aceite rojo O (*Oil red O*) 0,3% diluido en 60% de isopropanol. La diferenciación condrogénica y osteogénica se mantuvo durante 21 días. La condrogénesis se evidenció mediante el colorante Alcian Blue, que tiñe la deposición de colágeno y la osteogénesis se evidenció mediante rojo de alizarina S, que tiñe depósitos de calcio (Pittenger y cols., 1999) (Fig. 1).

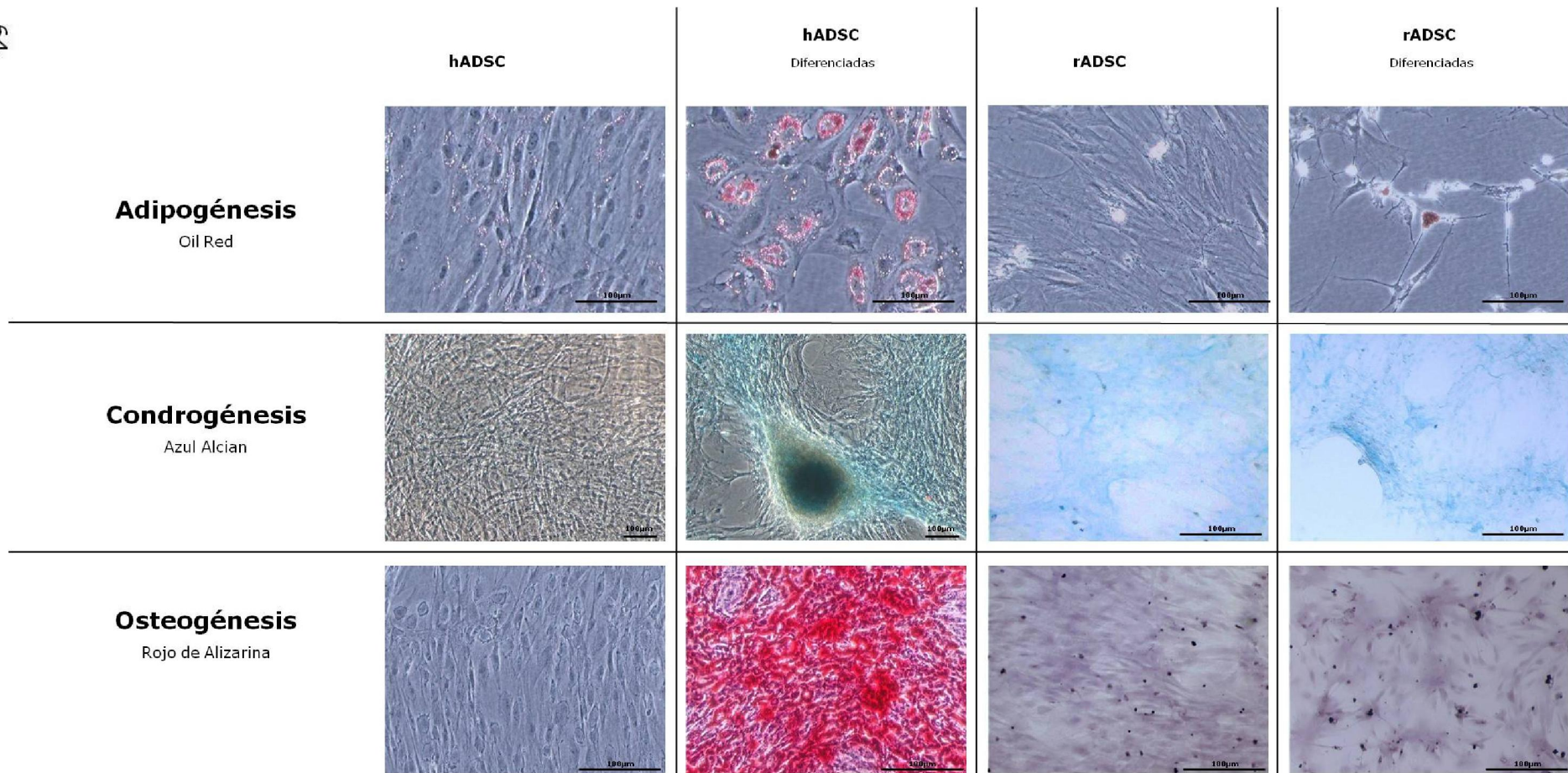


Figura 1. Diferenciación de las células mesenquimales durante 21 días. Barra de escala: 100µm

6. Obtención de fenotipo oligodendrocítico

6.1. Inducción farmacológica

Los eventos moleculares que acompañan a la diferenciación de OPCs han sido abordados en múltiples estudios (Dugas *y cols.*, 2006; Liu *y cols.*, 2007). Desde que Woodbury *y cols.* (Woodbury *y cols.*, 2000) y Sánchez-Ramos *y cols.* (Sánchez-Ramos *y cols.*, 2000; Cai *y cols.*, 2004), sugirieron que las células mesenquimales de médula ósea humanas y de rata poseían la capacidad de diferenciarse hacia la línea neuronal en cultivo utilizando un protocolo farmacológico, múltiples grupos de investigación han publicado que la aplicación de diversos "tratamientos inductores" para obtener neuronas en cultivo a partir de células mesenquimales de médula ósea o de tejido adiposo (Azizi *y cols.*, 1998; Kopen *y cols.*, 1999; Woodbury *y cols.*, 2000; Woodbury *y cols.*, 2002; Hermann *y cols.*, 2004; Lu *y cols.*, 2005; Neuhuber *y cols.*, 2005).

En el presente estudio se han intentado varios tratamientos inductores sobre las ADSCs cultivadas para obtener un fenotipo oligodendroglial funcional.

El día del pase, se sembraron las células sobre cubreobjetos de vidrio redondos ($\varnothing 12$ mm) estériles, a una densidad de 1000 células/cubre. Al cuarto día tras la siembra, se trataron las células con ácido retinoico (RA, del inglés *retinoic acid*), como factor "neuralizador" (Nistor *y cols.*, 2005; Joubert *y cols.*, 2010) en medio con suero ($\alpha 20$) o en medio definido (neurobasal + suplemento B27 con L-glutamina y antibiótico/antimicótico, NB + B27) durante 3 días. A continuación, se sometieron las células a distintas combinaciones de factores en NB + B27.

Factores utilizados (tratamientos):

- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB del inglés *platelet derived growth factor*) 20mg/ml: Factor de crecimiento necesario para la expansión de las células mesenquimales (Ng *y cols.*, 2008), que también es un factor central de la diferenciación de OPCs (Bogler *y cols.*, 1990). Cantidades moderadas de este factor se utilizan para una mejor supervivencia de los OPCs. En esta parte del estudio se utilizó la variante PDGF-BB debido a que actúa tanto en células mesenquimales como en oligodendrocitos.
- Dibutiril AMP cíclico (dbcAMP del inglés *dibutyril cAMP*) 1mM: Activador de la proteína kinasa A, que está implicada en la diferenciación de los OLs y en la mielinización del sistema nervioso central (Joubert *y cols.*, 2010).

- Neurotrofina-3 (NT-3, del inglés *Neurotrophin 3*) 20mg/ml: Cantidades moderadas de este factor producen una mejor supervivencia de los OPCs (Hu y cols., 2009).
- Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, del inglés *basic fibroblast growth factor*, también denominado FGF2) 20mg/ml: Factor de crecimiento necesario para la expansión de las células mesenquimales (Ng y cols., 2008). Implicado en la inducción neural (Bogler y cols., 1990), y la proliferación, tanto de células mesenquimales como neurales (Arsenijevic y cols., 2001; Chase y cols., 2010) evitando la diferenciación a motoneuronas (Hu y cols., 2009).
- Factor de crecimiento epidérmico (EGF del inglés *epidermal growth factor*) 20mg/ml: Implicado en la inducción neural, aumenta el rendimiento de los precursores y progenitores de oligodendrocitos (Hu y cols., 2009).

Como control positivo del proceso de mielinización, se utilizaron progenitores de oligodendrocitos procedentes de corteza cerebral de rata de 6 días de edad.

6.2. Reprogramación celular directa

Recientemente, dos laboratorios han publicado simultáneamente que los fibroblastos de ratón pueden convertirse en células oligodendrogiales mediante reprogramación directa con factores de transcripción que están implicados en el desarrollo del oligodendrocito (Najm et al., Nat. Biotechnol. 31:426, 2013, Yang et al., Nat. Biotechnol. 31:434, 2013). En el presente estudio hemos probado distintas combinaciones de cuatro factores propuestos en dichos trabajos (Sox10, Olig2, Nkx 6.1 y Zfp536) para producir oligodendrocitos funcionales a partir de ADSCs de rata. Estos factores fueron transfectados en las ADSCs mediante vectores lentivirales, incompetentes para la replicación, y los transgenes se encontraban bajo el control de un promotor de expresión condicional dependiente de tetraciclina (en nuestros experimentos, se utilizó el análogo doxiciclina como inductor por su mayor potencia y estabilidad en cultivo)

Siguiendo procedimientos que se describen más abajo (apartado 8.8 *Transducción de células mesenquimales*) los transgenes de reprogramación, junto con transactivador inducible por tetraciclina y los transgenes de reporteros fluorescentes, fueron infectados lentiviralmente en las ADSC.

La activación inicial de los transgenes con 2 μ M doxíciclina fue considerada como "día 0" de la reprogramación. Las células se mantuvieron en NBB27 con EGF (20 ng/ml), Biotina (10 ng/ml), PDGF-AA (10 ng/ml), FGF (20 ng/ml) y doxíciclina (2 μ M) durante todo el período de reprogramación incluso cuando poblaciones de presumibles PCOs estaban ya bien establecidas. Adicionalmente, se realizaron varios experimentos para comprobar si era posible acelerar dicha reprogramación mediante distintos tratamientos previos a la activación con doxíciclina:

- a. Pretratamiento adipogénico: Las células rADSCs se trataron con cóctel adipogénico en D10 durante 5 días y durante 4 días adicionales junto con doxíciclina. Utilizamos el medio de diferenciación adipogénica debido a que en estudios previos habíamos observado un cambio morfológico en parte de las ADSCs cuando son sometidas a este tratamiento que evocaba a las células neurales.
- b. Pretratamiento con RA: Las rADSCs se trataron con RA 1mM en NBB27 durante 5 días previos a la activación con doxíciclina.
- c. Pretratamiento combinado RA/adipogénico: Se trataron las rADSCs con RA (1 mM) durante 4 días en medio NBB27 y, posteriormente, se expusieron a un tratamiento de 5 + 4 días con cóctel adipogénico, como en el caso A. También se estudió esta combinación de modo inverso: primero la diferenciación adipogénica y posteriormente el tratamiento con RA.
- d. Pretratamiento con RepSox (inhibidor del receptor del TGF- β) (Ichida *y cols.*, 2009; Solanki y Lee, 2010; Liu *y cols.*, 2013; Cheng *y cols.*, 2014): Las rADSCs se trataron con RepSox (25mM) durante los 5 primeros días junto con la doxíciclina en NBB27 con EGF, Biotina, PDGF-BB y FGF.
- e. Pretratamiento RepSox/RA: Se incubaron las rADSCs en RepSox (25mM) y RA (1mM) en medio NBB27. Al 3er día, se sustituyó por medio NBB27 + RA 1 mM, y al 5º día se comenzó la inducción de los transgenes en medio NBB27 con EGF, Biotina, PDGF-BB y FGF + doxíciclina 2 μ M y RepSox 25 mM. En los cambios de medio posteriores no se volvió a añadir RepSox.

En otros experimentos adicionales, las células se trataron con el antibiótico de selección eucariota Zeocina (100-400 mg/ml), ya que el vector lentiviral FUW-Tet-O confiere resistencia a este antibiótico, por lo que aquellas células que no habían sido transducidas podían ser eliminadas. Sin embargo, como veremos más adelante, este método de selección no ofreció ventajas en cuanto a la pureza ni en

cuanto a la proliferación de las células transdiferenciadas, por lo que no se utilizó más.

7. Construcciones plasmídicas

7.1. rMBP-LeGO-C

La MBP (*myelin basic protein*) es uno de los principales componentes de la vaina de mielina y su nivel de expresión acompaña a su formación. Por ello consideramos interesante poder tener un reportero bajo el control del promotor de MBP que nos permitiera visualizar la adquisición de características oligodendrogliales en nuestras células reprogramadas.

Para ello, generamos una construcción plasmídica incorporando la secuencia del promotor de MBP de rata contenido en el plásmido 1323MBP-Luc cedido por Robin Miskimins (Miskimins *y cols.*, 2002; Wei *y cols.*, 2003) al plásmido LeGO-C (Lentiviral Gene Ontology vectors) y que hemos denominado rMBP-LeGO-C. Este promotor contiene la secuencia de 1,3 kb desde la posición -1323 a la +9, siendo 0 el punto de inicio de la transcripción del ARN del MBP de rata.

La secuencia del promotor de MBP fue extraída del plásmido vector (pGL3) mediante NotI (GC/GGCCGC) y BglII (A/GATCT) e insertada en el plásmido LeGO-C sustituyendo al promotor constitutivo (SFFV) que éste contenía (Fig. 2). Para la sustitución, el promotor SFFV fue extraído con NotI (GC/GGCCGC) y BamHI (G/GATCC), que es compatible con el producido por BglII). Además, para evitar la religación del promotor SFFV, los extremos de éste se inutilizaron mediante digestión con Tth111I (GACN/NGTC) y NheI (G/CTAGC). Ambas digestiones se purificaron por columna, usando Quiaquick PCR purification Kit, se ligaron utilizando la ligasa T4 (New England BioLabs, 16h 16°C), con una relación molar 1:3 (vector/inserto) y se transformaron bacterias con la ligación. Se seleccionaron las colonias positivas que dieran fragmentos de tamaño compatible con la inserción tras una digestión con XhoI (C/TCGAG). Finalmente se realizó una secuenciación del plásmido con los siguientes cebadores (*primers*) para comprobar que la secuencia se había insertado sin errores:

FW: ACGAGATTCCAGCAGGTCG

RV: GCCTTGGAGCCGTACATGA

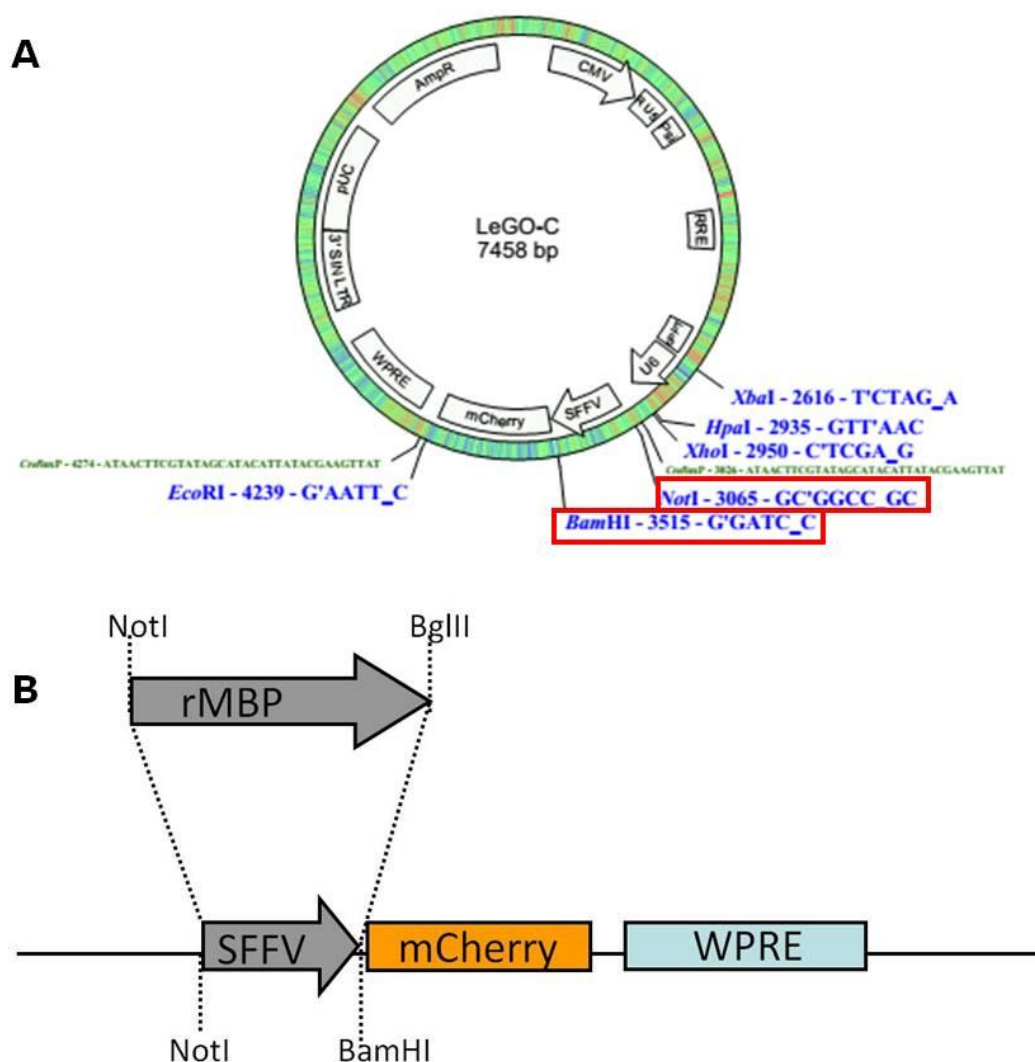


Figura 2. A. Construcción plasmídica original del LeGO-C; **B.** Lugar donde insertamos el promotor MBP en el LeGO-C.

7.2. hGFAPp-LeGO-G

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es la principal proteína de filamentos intermedios en los astrocitos y su expresión se utiliza como un marcador astrocitario. Por ello, consideramos interesante trazar la posible aparición y/o desaparición de células con fenotipo astrocitario en el cultivo mediante un reportero fluorescente, esta vez en color verde, que nos pudiera permitir su seguimiento en cultivo.

Hemos realizado una construcción plasmídica que llamamos hGFAPp-LeGO-G a partir del plásmido LeGO-G (Lentiviral Gene Ontology vectors), en el que se insertó el promotor humano de GFAP contenido en el plásmido gfaABC1D-lacZ (Fig. 3),

cedido por Michael Brenner (Su y cols., 2004; Lee y cols., 2008). El plásmido pGfa104 es similar al gfaABC1D-lacZ (Besnard y cols., 1991) con la adición de la primera parte de la región C y se ha comprobado que su expresión dentro del sistema nervioso central se restringe a los astrocitos (Su y cols., 2004). El promotor de GFAP se encuentra entre -1757 a -1256/-132 a +47 con respecto al inicio de la transcripción del ARN del GFAP humano.

Se obtuvo la secuencia del promotor de GFAP mediante PCR del plásmido vector gfaABC1D-lacZ mediante los *primers* complementarios de los extremos de su secuencia con adaptadores para enzimas de restricción:

FW: TGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTAACATATCCTGGTGTGGAG

RV: GTACCACCACACTGGATCCTGAGACTGGGGAATT

El producto de PCR se digirió con NotI (GC/GGCCGC) y BamHI (G/GATCC) para dejar extremos cohesivos. Simultáneamente, se extrajo el promotor constitutivo (SFFV) del plásmido LeGO-G con NotI (GC/GGCCGC) y BamHI (G/GATCC), al mismo tiempo que se inutilizaron los extremos del promotor SFFV, mediante digestión con Tth111I (GACN/NNGTC) y NheI (G/CTAGC), para evitar la religación de éste. Ambas digestiones se purificaron usando Quiaquick PCR purification Kit, se ligaron utilizando la ligasa T4 (New England BioLabs, 16h 16°C), con una relación molar 1:3 (vector/inserto) y se transformaron bacteria la ligación (Fig. 2). Se seleccionaron las colonias positivas que dieran fragmentos de tamaño compatible con la inserción tras una digestión con SmaI (CCC/GGG). Finalmente se realizó una secuenciación del plásmido, para comprobar que la secuencia se había insertado sin errores, con el siguiente *primer*:

FW: ACGAGATTCCAGCAGGTCG

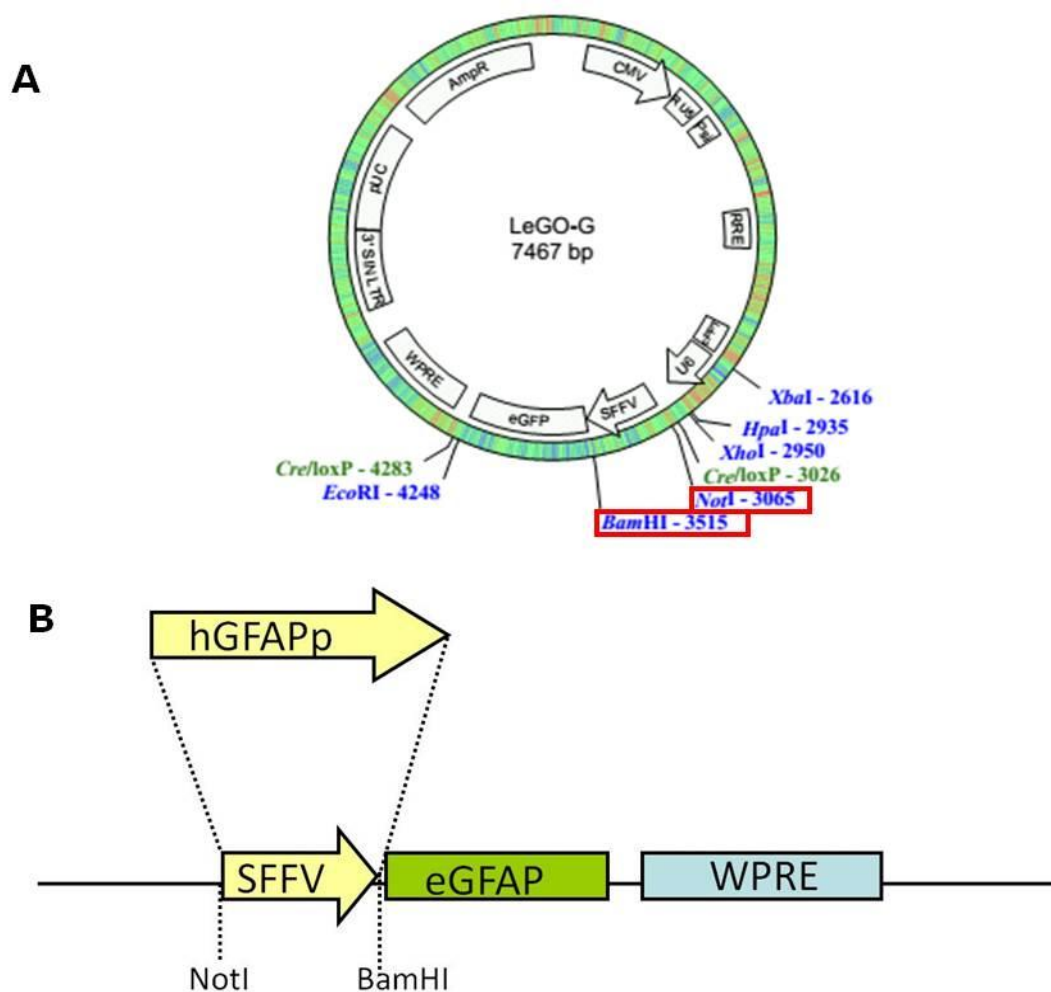


Figura 3. A. Construcción plasmídica original del LeGO-G; **B.** Lugar donde insertamos el promotor hGFAPp en el LeGO-G.

8. Técnicas de biología molecular

8.1. Inmunocitoquímica

La caracterización de las ADSC en cultivo se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia. Las células, cultivadas sobre cubreobjetos redondos en el interior de placas multipocillo P24, se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% a pH 7.4 y se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (PBS). A continuación, los cultivos fueron post-fijados/permeabilizados con etanol:acético (95:5) a -20°C durante 10 minutos, excepto cuando se utilizaron los anticuerpos O1, O4 y A2B5 debido a la composición lipídica del antígeno y a su localización en la superficie de la membrana.

Los cubreobjetos se extrajeron de la placa, se colocaron en una cámara húmeda y se procedió a la incubación en solución de bloqueo (5% de suero normal de cabra en PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con 40-60 μ l de anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo correspondiente, durante toda la noche a 4° C (excepto los anticuerpos que se unen a antígenos de superficie de membrana, que se incubaron 2 hr a Tª ambiente). Finalmente, tras 3 lavados en PBS, los cultivos se incubaron durante 30-45 min a Tª ambiente y en oscuridad con los anticuerpos secundarios dirigidos contra las especies en las cuales el anticuerpo primario fue obtenido, conjugados con fluorocromos. Durante los lavados se realizó una incubación de 5 min con 10⁻⁵ M bisbenzimidaz (Hoechst 33342), que es un fluorocromo que se intercala en el DNA, para teñir todos núcleos celulares. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron en agua destilada y se montaron sobre portaobjetos utilizando medio anti-decolorante.

Los anticuerpos utilizados, primarios y secundarios, y los demás reactivos para la inmunocitoquímica están expuestos en la tabla 1.1.

8.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas

Para la extracción de las proteínas totales, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados en solución salina a 4° C. Tras retirar todo el líquido del frasco, se rascaron las células con *cell scrapers* en presencia de pequeños volúmenes de tampón de lisis, compuesto de Tritón 0.5%, SDS 0.1%, Tris HCl 1M, KCl 10 mM, Ditiotretitol 1 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, leupeptina 10 μ g/ml, Aprotinina 1 μ g/ml, NaF 20mM y ortovanadato sódico 8 mM. El lisado se transfirió a un tubo eppendorf, se sometió a una congelación/descongelación para incrementar la eficiencia de la lisis, y se sonicó durante 30 s. Se centrifugó a 14000 x G, quedándonos con el sobrenadante, del cual se utilizó una pequeña alícuota para determinar la concentración proteica y el resto se utilizó para los análisis.

La concentración de proteínas de las muestras se determinó con el método del ácido bicinónico (BCA). El ensayo de BCA combina el principio de la reducción por parte de las proteínas de ión Cu⁺² a ión Cu⁺¹ en presencia de medio alcalino (reacción de Biuret), con la alta sensibilidad de detección colorimétrica de los cationes Cu⁺¹ por BCA. El producto de la reacción de este ensayo está formado por la interacción de dos moléculas de BCA con una molécula de ión cuproso (Cu⁺¹). Este compuesto presenta absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Se usa

siempre una curva patrón con albúmina de suero bovina con concentraciones crecientes desde 2.5 a 100 µg/µl. Todas las medidas espectro-fotométricas se realizaron en un lector de placas automático (SpectraFluor, Tecan, Salzburgo, Austria).

Alícuotas de 30 o 60 µg de proteína preparadas en tampón de carga 5X (0.186 M Tris, 0.25 mg/ml azul de bromofenol, 6% β-mercaptoetanol, 15% v/v glicerol y 9% p/v SDS) se sometieron a 96° C durante 5 min y se cargaron en geles de poliacrilamida al 10-15% en condiciones desnaturalizantes para separar las proteínas mediante electroforesis continua (SDS-PAGE). Seguidamente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF mediante electrotransferencia.

Para el inmunomarcaje, las membranas se bloquearon con un 2% del agente de bloqueo del kit ECL prime (GE Healthcare) en PBS-Tween (tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 y detergente Tween-20 de Bio-Rad al 0.01%), durante una hora a temperatura ambiente, con el fin de evitar uniones inespecíficas. Tras el bloqueo, la membrana se incubó a 4 °C con el anticuerpo correspondiente diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche. La membrana se lavó abundantemente con PBS y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios. Tras el lavado, las bandas inmunorreactivas se visualizaron por el método de detección por quimio-luminiscencia (ECL GE Healthcare) utilizando el aparato VersaDoc de Bio-Rad con el programa QuantityOne, para valorar la intensidad de las bandas por densitometría (Image Quant TL), o el FluorChemE, de ProteinSimple (Santa Clara, CA, USA).

En otros casos, se utilizaron anticuerpos secundarios IgG fluorescentes y se utilizaron los escáneres de fluorescencia Typhoon (GE Healthcare), para detectar las bandas en el espectro UV y visible, y Odyssey (Li-Cor), para marcajes en rojo lejano.

Los anticuerpos utilizados están descritos en la tabla 1.1.

Como control de carga proteica se reincubaron las membranas con anticuerpos contra la β-actina o contra GAPDH, revelados con el sistema quimioluminiscencia o de fluorescencia.

8.3. RT-PCR

Para la extracción del RNA se utilizó el *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare) o el *RNeasy Mini kit* (Qiagen). Con estos kits las células son lisadas en una solución concentrada de iones caotrópicos que, además, inhibe las RNAsas. La adición de iones caotrópicos a los ácidos nucleicos destruye la estructura ordenada de moléculas de agua a su alrededor, lo cual crea un entorno hidrofóbico. En estas condiciones, los ácidos nucleicos se quedan unidos a la sílice de las columnas e purificación, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros componentes del lisado se eluyen en el lavado. El DNA es eliminado mediante la aplicación de DNasa I libre de RNAsas. Posteriormente, el RNA se eluye al pasar por la columna de sílice tampones ligeramente alcalinos de baja fuerza iónica o, simplemente, agua libre de RNAsas, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la sílice.

Una vez obtenido el RNA, se utilizó el *First Strand cDNA Synthesis kit* (Fermentas). Este kit sintetiza DNA-copia (cDNA) a partir de RNA mensajero utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV, del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus*). La enzima actúa a 37°C y es adecuada para la síntesis de cDNAs hasta 9 kb. El inhibidor de RNAsas RiboLock, suministrado en el kit, evita la degradación del RNA hasta temperaturas de 55°C. El kit contiene oligo-(dT) que se utilizan como *primers* para la transcripción inversa de un cDNA a partir del RNA al unirse selectivamente a la secuencia poli(A) del extremo 3' del RNA mensajero, con lo cual se sintetiza una primera cadena de cDNA. Ésta se utiliza como plantilla para la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando cebadores ("*primers*") específicos del RNA mensajero que queremos determinar.

Para la PCR se utilizó el Kit de *GE Healthcare, Illustra PureTaq Ready-To-Go PCR beads*. Este kit amplifica la secuencia de DNA específica mediante el uso de nucleótidos (dNTPs), un tampón de alta calidad y una DNA polimerasa recombinante (Taq-polimerasa de *Thermus aquaticus*), con gran eficacia y reproductibilidad. Alternativamente, se utilizó *AmpliTaq DNA Polymerase* y dNTPs.

El producto final de la RT-PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1-2.5%, dependiendo del tamaño del amplicón (Sambrook, 2001).

8.4. Purificación del ADN plasmídico

Los plásmidos portadores de los genes o los promotores se clonaron transformando bacterias competentes DH5 α o XL1-Blue y se seleccionaron colonias en placas de agar con antibiótico de selección bacteriana (generalmente ampicilina), que fueron posteriormente cultivadas en medio LB con el antibiótico y centrifugadas para obtener un *pellet*. Los plásmidos adquiridos en Addgene, incorporados en sus propias bacterias se procesaron de manera similar, siguiendo las instrucciones incluidas. La extracción del ADN plasmídico se realizó mediante lisis alcalina con detergentes (Birnboim y Doly, 1979). La exposición de la suspensión bacteriana al pH alto del detergente aniónico rompe las paredes celulares bacterianas, liberando el ADN plasmídico en el sobrenadante.

Para la extracción del DNA se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps (Promega), el Plasmid Maxi Kit (Quiagen) o el PhoenIX Maxiprep Kit (que se utilizó para los plásmidos que iban a ser transfectados en células eucariotas, por garantizar un bajo contenido en endotoxinas), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Los kits comerciales de purificación del plásmido, tanto miniprep como maxiprep, están basados en cromatografía de intercambio de iones a través de una columna en fase sólida. Los lisados bacterianos se eliminan por centrifugación. El ADN plasmídico, en condiciones de baja concentración de sales y a un pH adecuado, se une selectivamente a la resina de la columna, mientras que el ARN, proteínas, metabolitos, y otras impurezas de bajo peso molecular se eliminan. Posteriormente, el ADN plasmídico puro se eluye en tampón de alta salinidad. Este ADN se concentró y desaló mediante precipitación con isopropanol y posterior centrifugación. Finalmente, se calculó la concentración y la pureza del ADN midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en espectrofotómetro Nanodrop. Únicamente los ADN con relación 260/280nm \sim 1.8 fueron utilizados en los experimentos.

8.5. Adición de secuencias de farnesilación

Con la intención de anclar en las membranas las proteínas reporteras fluorescentes, de tal manera que la célula transducida con dicho reportero mostrara toda su membrana plasmática coloreada (lo cual es particularmente interesante si se pretende seguir el proceso de mielinización de un oligodendrocito), se añadieron en el extremo 3' de la secuencia de la proteína fluorescente 12 bases adicionales que conferirían a la proteína generada la capacidad de ser farnesilada. La

farnesilación de las proteínas depende de que contengan la secuencia con el motivo –CaaX (“C” es cisteína, “a” es un amino ácido alifático y “X” es variable) en su extremo C-terminal, además de otros aminoácidos peculiares en posiciones previas, lo cual permite a la farnesil transferasa sustituir el motivo CaaX por un S-farnesilo. Esto le confiere a la proteína farnesilada una naturaleza hidrofóbica y la asocia a las membranas lipídicas (Maurer-Stroh y cols., 2007), como ocurre con las proteínas de la superfamilia Ras. Utilizando la PrePS-Prenylation Prediction Suite (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/>), que predice la probabilidad de farnesilación de una secuencia proteica, comprobamos que añadiendo la secuencia CVIM de amino ácidos que confiere la capacidad de farnesilación al K-Ras-B, tanto la proteína reportera GFP como la *Cherry* se acumulaban en membranas celulares y dibujaban perfectamente el contorno de las células (Fig. 4).

Se obtuvo una secuencia de farnesilación mediante PCR de los plásmidos reporteros con los siguientes *primers*:

FW: GTACAAGAAGAAGAAGTCAAAGACAAAGTGTGTAATTATGTAAG

RV: AATTCTTACATAATTACACACTTTGTCTTTGACTTCTTCTTCTT

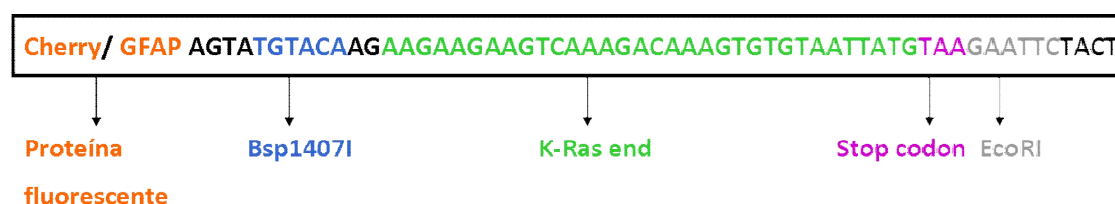


Figura 4. Secuencia de farnesilación K-Ras end que incluimos en los plásmidos.

Esta secuencia se insertó entre Bsp1407I (T/GTACA) (que se encuentra justo antes del codon STOP de la proteína fluorescente), y el sitio de restricción EcoRI (G/AATTC) en los plásmidos LeGO-C y LeGO-G, así como en nuestras construcciones plasmídicas rMBPp-LeGO-G y hGFAPp-LeGO-G. Se purificaron ambas digestiones usando Quiaquick PCR purification Kit, se ligaron (ligasa NEB, 16h 16°C) y se clonaron en bacterias.

Comprobamos si los plásmidos obtenidos contenían la secuencia de farnesilación mediante PCR en la que el *primer* FW utilizado hibridaba, al menos parcialmente, con la secuencia insertada. Una vez comprobado que se obtenía un fragmento amplificado por PCR, se secuenciaron los plásmidos con el *primer* RV, para analizar

la corrección de la secuencia. Los *primers* diseñados, que servían para todos los plásmidos mencionados, fueron:

FW: CATGGACGAGCTGTACAAGAAG

RV: GGCATTAAAGCAGCGTATCCA

Una vez obtenidos todos los plásmidos con la secuencia terminal de K-ras y secuenciados, se realizaron pruebas de transfección transitoria en células 3T3, Glioma C6, células neurales y en las propias ADSC. Esto se realizó para evaluar la eficacia, la capacidad de las células de transfectarse y para observar la localización de las diferentes proteínas fluorescentes, con y sin promotor constitutivo, en la membrana. Estas transfecciones fueron analizadas por medio de citometría de flujo.

8.6. Producción, concentración y titulación lentiviral

Durante la última década, lentivirus derivados del VIH han sido comúnmente utilizados para la transferencia génica debido a su capacidad de infectar una amplia variedad de células, tanto proliferantes como no proliferantes, e integrar transgenes de forma estable en el genoma del huésped (Weinberg *y cols.*, 1991; Bukrinsky *y cols.*, 1992; Lewis *y cols.*, 1992; Naldini *y cols.*, 1996; Gower *y cols.*, 2014).

Para la producción lentiviral se utilizó la línea celular empaquetadora 293T. Los plásmidos lentivirales para la transferencia de genes son de 3ª generación pero se empaquetaron cotransfectando dicho plásmido lentiviral con un plásmido empaquetador (psPAX-2) y un plásmido de la envoltura viral (pCMV-VSV-G), que son de 2ª generación.

Para la producción de lentivirus, se sembraron las células 293T en frascos T75 en medio DMEM con 10% FBS y se incubaron a 37° C. La cotransfección se realizó mediante lipofección en medio OptiMEM sin suero con el cultivo al 80-90% de confluencia. La mezcla de transfección consistió en 10 µg del plásmido lentiviral que contenía los transgenes, 4,6 µg de PAX-2, 2 µg de VSV-G y 26 µl de Lipofectamine 2000 (Fig. 5). Después de 5 horas de cultivo, se cambió el medio de la transfección por DMEM con 10% FBS (tiempo 0). Se recogió el medio de cultivo que contenía las partículas lentivirales liberadas cada 24 horas durante tres días y se hizo un pool. Posteriormente, se pasó el medio por filtros de 0.45 µm (Millipore) y se concentraron los lentivirus mediante ultracentrifugación (Beckman Coulter

Serie Optima™ L) a 50000 x G durante 3 horas a 4°C en 20% sacarosa (Gower y cols., 2014).

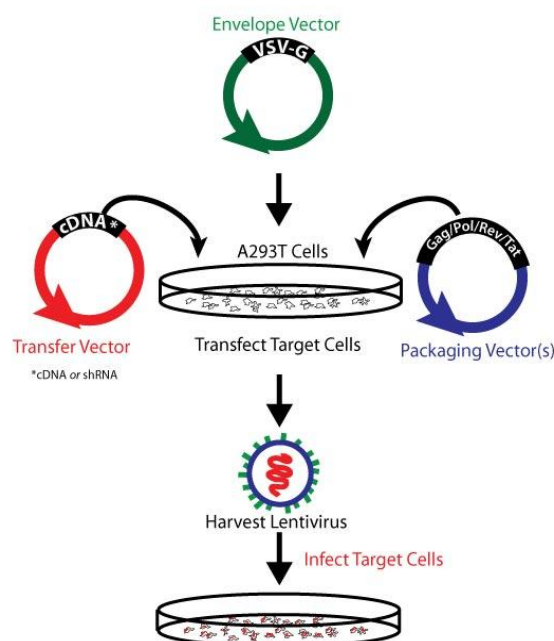


Figura 5. Producción de lentivirus. Imagen del catálogo de Addgene.

El paso de concentración lentiviral es crítico para la obtención de un alto título viral. A diferencia de la labilidad de los vectores retrovirales, los lentivirus resisten sin dificultades velocidades y tiempos elevados de centrifugación, facilitando su concentración. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de bioseguridad y el material y líquidos desechados fueron inactivados en solución de lejía al 10% antes de su descarte. Los lentivirus obtenidos se almacenaron a -80° C en pequeñas alícuotas.

Para la titulación lentiviral utilizamos el kit comercial Lentivirus qPCR kit (Applied Biological Materials) que realiza una extracción rápida de ARN seguida de RT-qPCR de alta sensibilidad y eficacia. El kit, además de la mezcla que incluye *primers* dirigidos a la región 5' LTR específica de lentivirus y la transcriptasa inversa para la RT, contiene dos estándares STD1 y STD2 a concentración de 5×10^7 UI/ml y $6,25 \times 10^6$ UI/ml, respectivamente (UI: unidades infecciosas). Se realizó la PCR cuantitativa en un equipo LightCycler® 480 utilizando la ADN polimerasa LightCycler® 480 SYBR Green I Master. Los datos obtenidos por este kit fueron

comparados con los obtenidos por citometría de flujo de células 3T3 transducidas con lentivirus de las proteínas fluorescentes, para tener una estimación de la relación que existía entre las UI que nos proporcionaba el kit (que hace referencia a número de partículas lentivirales presentes) y las UI reales, es decir, las que tienen en cuenta la eficiencia de infección de esas partículas obtenidas en nuestras condiciones.

8.7. Transducción de células mesenquimales

La infección lentiviral se realizó a las 24 horas de la siembra en pocillos de placa P24 cuando el cultivo de rADSC tenía una confluencia aproximada del 80-90%. Previamente, se realizó un conteo del número de células sembradas en pocillos vecinos en las mismas condiciones para estimar la cantidad de partículas lentivirales que se requerían. En base a nuestra experiencia, elegimos una proporción de 5 UI por célula rADSC. En el caso de las hADSC, utilizamos una proporción de 10:1.

Se descongelaron los lentivirus, manteniéndolos en hielo durante todo el proceso. Se sustituyó el medio de las células por una mezcla con los lentivirus más 8 µg/ml polibreno (para mejorar la eficacia de infección) en medio α 20. Las células con los lentivirus se incubaron en centrifugación en una centrífuga Eppendorf 5810R a 1000 x G durante 1 hora a 37° C. Posteriormente se mantuvieron durante 30-60 min adicionales en el incubador, al cabo de los cuales se sustituyó el medio por nuevo medio de crecimiento α 20. En el caso de las hADSC este medio de crecimiento fue MesenPro.

8.8. Inmunoselección magnética de células O4⁺

La selección inmunomagnética se basa en la unión partículas superparamagnéticas de 50 nm conjugadas a anticuerpos altamente específicos contra un antígeno particular en la superficie celular y su posterior separación tras pasar por las columnas MS, miniMACS (Miltenyi). Éstas contienen una matriz compuesta de esferas que en las cercanías de un imán amplifican su campo magnético 10.000 veces. Cuando se pasa la suspensión celular que se ha reaccionado previamente con anticuerpos conjugados a las nanopartículas magnéticas por la columna colocada en el interior de un imán, las células no inmunomarcadas pasan libremente a través de ésta mientras que las células

marcadas magnéticamente se quedan retenidas. Tras retirar la columna del soporte magnético, se pueden eluir las células que estaban retenidas.

Todo el procedimiento de inmunoselección se realizó en condiciones de esterilidad. Las células se levantaron del frasco con Accutase, se centrifugaron 3 minutos a 1500 RPM y se resuspendieron en tampón de bloqueo (PBS + 0.5% BSA + 2 mM EDTA) y se comprobó que estaban totalmente dispersas. Tras centrifugación, las células se resuspendieron en 50 μ l de anticuerpo O4 (sobrenadante puro) durante 20 min en hielo. Se añadió 1 ml de tampón de bloqueo y se centrifugó, quedándonos con el *pellet* celular. Las células se resuspendieron en 100 μ l de anti-mouse IgM-Microbeads (Miltenyi 130-047-302) 1:5 + anti-mouse IgG Alexa 568 1:1000 (para evaluar la eficiencia de la inmunoselección) y se incubaron otros 20 min a 4° C. Tras añadir 1 ml de tampón de bloqueo, centrifugarlas y resuspenderlas completamente en 500 μ l de tampón, las células se dispensaron en la columna MACS, colocada en el soporte magnético. Se añadieron líquidos de lavado y la dispersión celular eluída se recogió en un tubo estéril marcado como "fracción negativa". A continuación se extrajo la columna del soporte magnético y se pasó nuevo líquido de lavado y se recogieron las células eluídas en otro tubo marcado como "fracción O4+". Ambos tubos se centrifugaron y se resuspendieron en medio de mantenimiento de células reprogramadas. Se sembró 1/6 de cada fracción celular sobre cubreobjetos para cuantificar la eficacia de la selección y los 5/6 restantes se sembraron en sendos frascos de cultivo para expansión.

9. Estudio de la funcionalidad de las células transdiferenciadas

9.1. Obtención y cultivo de neuronas de los ganglios dorsales

El cultivo de neuronas sensoriales se realiza a partir de los ganglios de las raíces dorsales (DRG) obtenidos de fetos de 17 días de gestación según el procedimiento de Kleitman y Bunge (Kleitman y cols., 1991) con modificaciones.

En medio Leibowitz L-15, se aisló la porción cervico-torácica de la columna vertebral y la médula espinal se expuso al disecar los cuerpos vertebrales mediante cortes a ambos lados. Tirando cuidadosamente de la médula espinal, se extrajo ésta con la cadena de ganglios sensoriales adheridos a ella. Se separaron los ganglios del ensanchamiento cervical (8 ganglios/feto), quitando en lo posible restos de nervio y de perineurio. Se calculó una cantidad de 1 ganglio por cada

cubreobjeto a sembrar. Se lavaron los ganglios en Hank's BSS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) y se incubaron durante 15 minutos a 37°C con tripsina 0.05% + EDTA 2 mM en HBSS en una placa petri sobre agitador orbital. Se detuvo la digestión enzimática añadiendo D10 y se transfirieron los ganglios a un tubo de centrifuga estéril. Tras retirar el sobrenadante se añadió 1 ml de D10 y se trituraron los ganglios mediante pipeteo repetido (20 veces) con una P1000 cuyas puntas de plástico con filtro habían sido ligeramente flameadas para reducir y redondear el agujero de entrada. Se pasó la suspensión celular por una malla de $70\text{ }\mu\text{m}$, para retirar el tejido no dispersado (que contenía vasos sanguíneos, perineurio y fragmentos de nervio que, por su contenido en colágeno no fueron triturados con esta dispersión mecánica suave). Se añadió 1 ml adicional de D10 para hacer pasar todas las células dispersas por la malla, se centrifugó la suspensión celular y se resuspendió en 2.4 ml de D10 con β -NGF ($50\mu\text{g/ml}$) por cada placa de 24 cubreobjetos que se fuera a sembrar. Previamente, los cubreobjetos habían sido colocados en el interior de placas multipocillo P24 y recubiertos con Poly-L-ornitina. Se dispensó $100\text{ }\mu\text{l}$ de suspensión celular en cada cubreobjetos (en gota, sin extenderse por el resto del pocillo) y se incubaron las células durante 24 h con las placas dentro de contenedores humidificados. Al día siguiente se añadieron $300\text{ }\mu\text{l}$ de HBSS a cada pocillo y se retiró todo el medio, poniendo en su lugar NBB27 + β -NGF con fluorodeoxiuridina ("floxuridina") $10\text{ }\mu\text{M}$ + uridina $10\text{ }\mu\text{M}$ como antimitóticos durante 3 días para matar las células en división (células de Schwann, fibroblastos y algunos contaminantes de vasos sanguíneos). Con un solo pulso de 3 días de antimitóticos se obtenían cultivos conteniendo neuronas de DRG (DRGn) que habían establecido un red de axones con suficiente pureza para el cocultivo con oligodendrocitos. Si se requiere un cultivo más puro, se pueden dar pulsos adicionales de antimitóticos de 2-3 días alternados con períodos similares libres de antimitótico. Tras retirar el medio con antimitóticos (que fue descartado en el contenedor especial para citostáticos), se lavaron las células con HBSS y se mantuvieron al menos 3 días más en NBB27 + β -NGF.

9.2. Mielinización en cultivo

Para el co-cultivo de oligodendrocitos o células reprogramadas con DRGn, se cambió el medio en los cultivos por NBB27 + β -NGF + doxiciclina y 2 horas después se añadieron cuidadosamente $20\text{ }\mu\text{l}$ de suspensión celular sobre la zona central del cubreobjetos, de tal manera que las células se adhirieron preferentemente sobre esa zona central. El medio se recambió cada 3-4 días. Los co-cultivos se

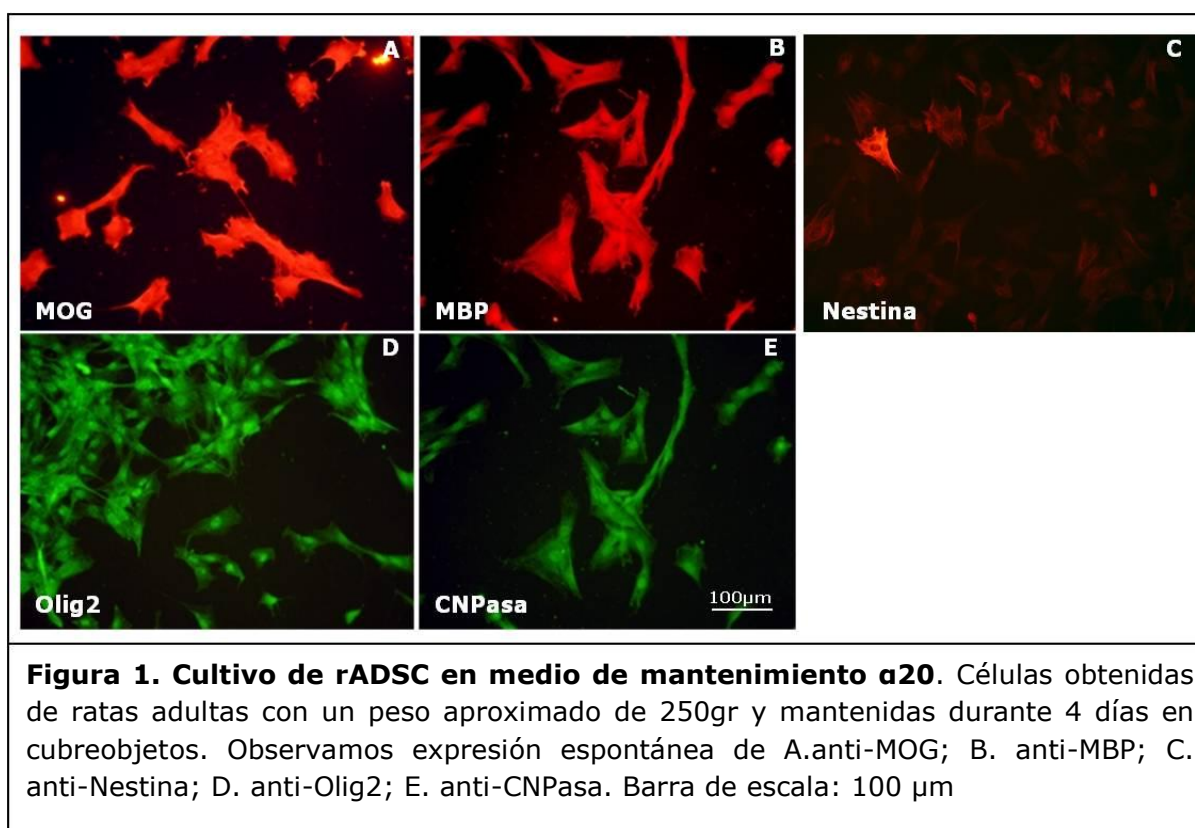
mantuvieron durante 1-8 semanas adicionales para permitir la mielinización espontánea. En algunos casos los co-cultivos fueron tratados con benztropina (1,5 μ M) durante una o tres semanas para fomentar la diferenciación de los oligodendrocitos (Deshmukh y *cols.*, 2013). Se analizó el desarrollo de la mielinización mediante inmunofluorescencia para O1, MBP o MOG (marcadores de oligodendrocitos y mielina) frente a β III-tubulina (marcador axónico).

Resultados

1. Obtención de fenotipo oligodendrocítico por inducción farmacológica

En las presentes condiciones de cultivo (siembra a 666 células/cm², mantenimiento en α 20, con pase semanal) las ADSC de rata proliferaron a ritmos en los que la población se multiplicaba de 30 a 40 veces por semana durante los 3-4 primeros pases. Aunque la morfología general de las células era homogénea, (de tipo fibroblastoide, alargadas y aplanadas) coexistían en el cultivo pequeñas áreas de células con morfología también plana pero más redondeadas, y otras células muy aplanadas y extensas y con largas estrías paralelas visibles al contraste de fases (probablemente, miofibroblastos diferenciados).

En estas condiciones basales, los análisis inmunocitoquímicos mostraron que las células se teñían de forma espontánea para marcadores oligodendrogiales como O1, en un pequeño porcentaje de células, y Olig2, CNPasa, MOG, y MBP en todas ellas. No pudimos demostrar marcaje inmunocitoquímico para Sox-10 (Fig. 1).



En las células ADSC humanas (hADSC), en condiciones basales, se observó la tinción para los mismos marcadores oligodendrogiales que en las rADSC, aunque con patrones algo diferentes (Fig. 2). De hecho, el número de células teñidas con O1 en condiciones basales era más elevado.

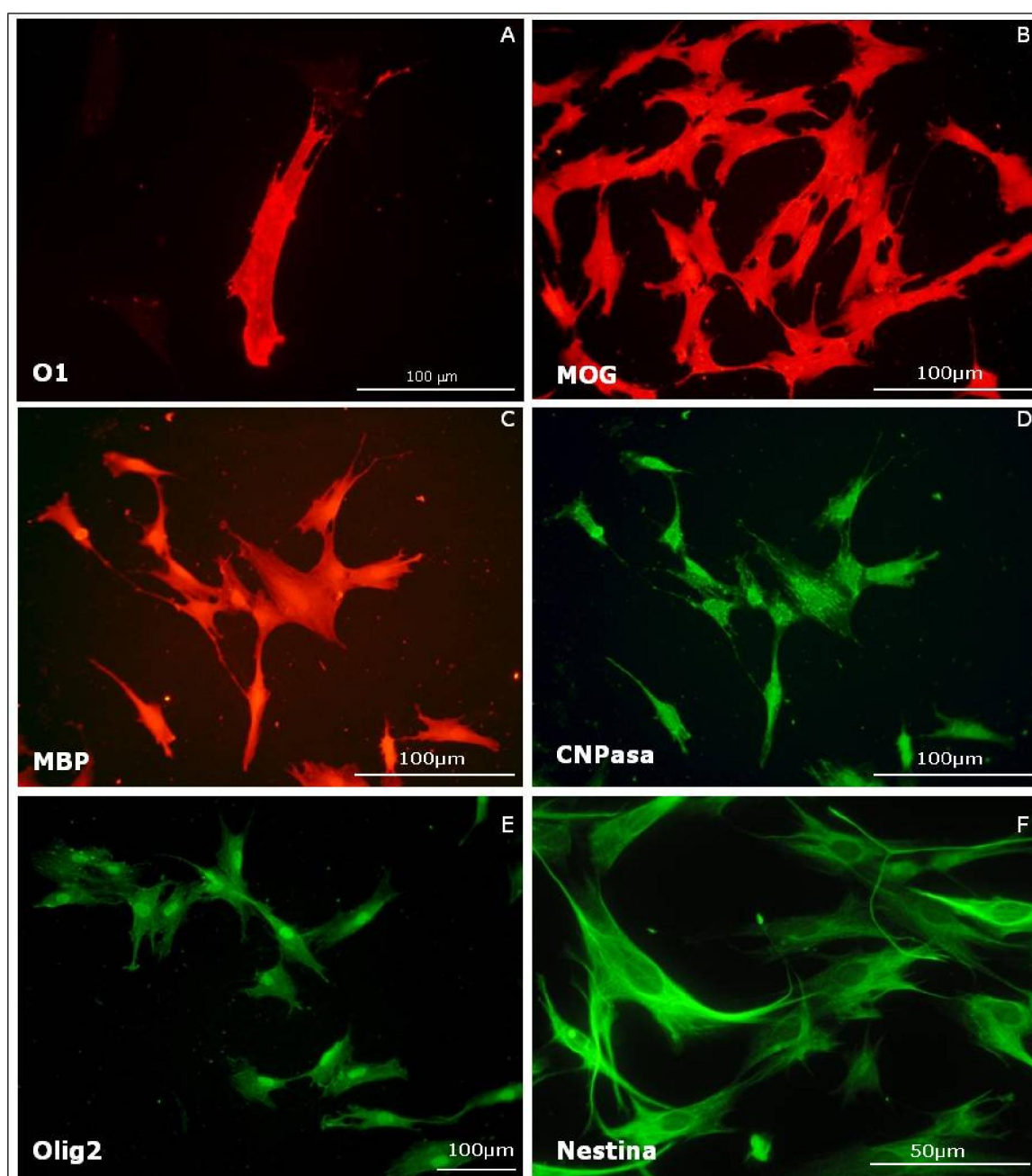
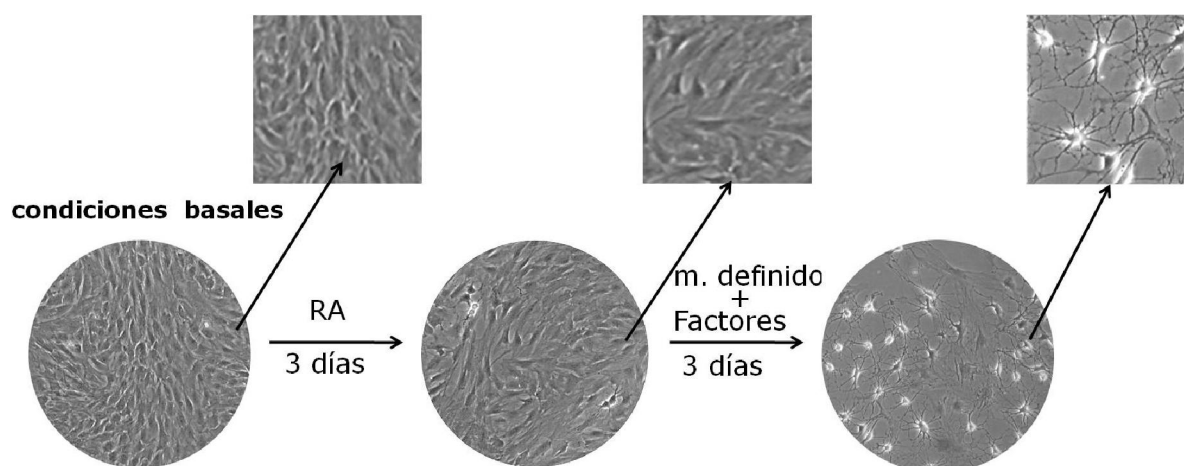


Figura 2. Cultivo de hADSC en medio de mantenimiento MesenPro.

Células obtenidas del pániculo adiposo y mantenidas durante 4 días en cubreobjetos. Observamos expresión espontánea de A. O1; B. anti-MOG; C. anti-MBP; D. anti-CNPasa; E. anti-Olig2; F. anti-Nestina. Escala A,B,C,D y E: 100 µm y F: 50 µm

1.1. Tratamientos inductores para la diferenciación oligodendroglial



Se aplicaron a los cultivos de ADSC varias combinaciones de factores cuya participación en la diferenciación de los oligodendrocitos ha sido descrita. El tratamiento se realizó en dos fases, de 3 días cada uno: una primera fase de "neuralización" mediante la aplicación de ácido retinoico y una segunda fase de diferenciación mediante la aplicación de combinaciones de diversos factores de crecimiento (EGF, bFGF, PDGF-BB, NT3) y/o dibutilil AMP cíclico (dbcAMP o bucladesina).

Los diversos tratamientos produjeron cambios en la proliferación y en la morfología de las ADSC. Así, el medio definido detuvo la proliferación en gran medida y se produjeron morfologías más planas y menos alargadas. También se pudieron observar células de cuerpo refringente con unas pocas prolongaciones (morfología que, en otros estudios, se ha considerado "neuronal", por su aspecto).

Los tratamientos que incluían EGF o bFGF produjeron proliferación celular y un aumento en la cantidad de células con morfología bipolar y alargada, los que incluían PDGF-BB mostraron una elongación de los procesos y los que incluían dbcAMP produjeron una detención de la proliferación acompañada de un cambio morfológico notable (en pocas horas) mostrando una gran cantidad de células refringentes con procesos.

El cambio morfológico observado tras el tratamiento con dbAMPc en las células rADSC, no fue observado en las hADSC, lo que confirma que ambos tipos de cultivos poseen características que los hacen diferentes, a pesar de su mismo origen (panículo adiposo subcutáneo inguinal), su elevada tasa de proliferación en medio de cultivo con alto suero y sus similitudes morfológicas, inmunocitoquímicas

y de diferenciación a tejidos de tipo mesodérmico. Sin embargo, entre las características diferenciales podemos citar que las rADSC no proliferan de manera indiferenciada en medios específicos, como el MesenPro, donde sí lo hacen las hADSC.

1.1.1. Caracterización inmunocitoquímica de las rADSC tras los tratamientos inductores

a) Marcaje con O1

El O1 es un anticuerpo monoclonal que ha sido profusamente utilizado por muchos grupos de investigación para la identificación de oligodendrocitos maduros. Reacciona esencialmente con el galactocerebrósido. También puede unirse a otros dos galactolípidos, la psichosina y el monogalactosildiacilglicerol, si bien éstos son minoritarios en condiciones no patológicas en animales. También es un marcador de superficie de la mielina de oligodendrocitos. Esto hace que el marcaje con O1 sea particularmente interesante para estimar la similitud de las ADSC con las células promielinizantes.

Como se apunta más arriba, en condiciones basales de proliferación indiferenciada en cultivo en medio $\alpha 20$, un pequeño número de las rADSC (0,02%) mostraba marcaje membranal con O1 (mO1+). En el caso de hADSC humanas en medio de cultivo MesenPro, la población de células marcadas es mayor, alrededor de un 10,6% (Fig. 3).

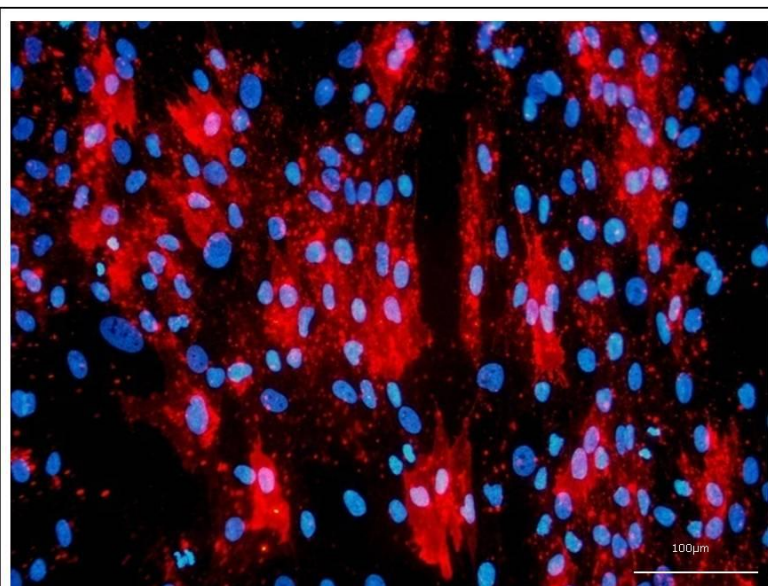


Figura 3. Células hADSC marcadas con O1 (rojo) y bis-benzimida (azul). Barra de escala: 100 μ m

Además de las células mO1+, una gran parte de las células mostraba marcaje punteado, aparentemente citoplásmico, a juzgar por su distribución preferente alrededor del núcleo. Dado que las células no fueron permeabilizadas antes de la tinción inmunofluorescente, podría sospecharse que este marcaje intracelular era inespecífico o artefactual. Sin embargo, varios datos apuntan a que se trata de un marcaje específico: 1. la distribución del marcaje coincide aparentemente con retículo endoplásmico, lugar de síntesis final del galactocerebrósido; 2. la tinción intracelular desaparece tras el cambio a medio definido; 3. en tinción posterior con filipin, marcador fluorescente de colesterol, se observó co-localización de ambos marcadores en una parte de los puntos (Fig. 4).

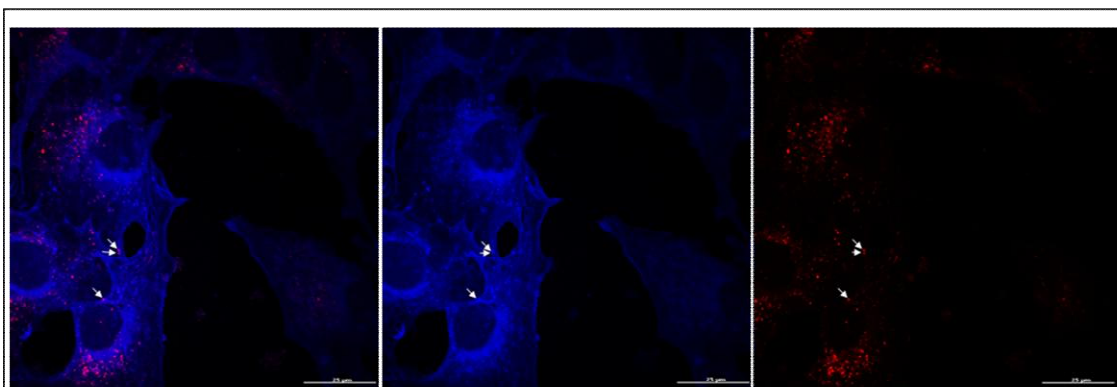


Figura 4. Marcaje de hADSC con filipina y O1. La filipina en ocasiones co-localiza con el marcaje intracelular de O1. Filipina (azul) y O1 (rojo). Barra de escala: 25 μ m

Otra característica del marcaje con O1 en las células control es la presencia de “*blebs*” o ampollas de hasta 5 μ m de diámetro en la superficie de las células positivas. Estas ampollas parecen desprenderse de las células y pueden transportar material citoplásmico de las ADSC a distancia como las microvesículas, aunque éstas suelen ser de menor tamaño (Fig. 5).

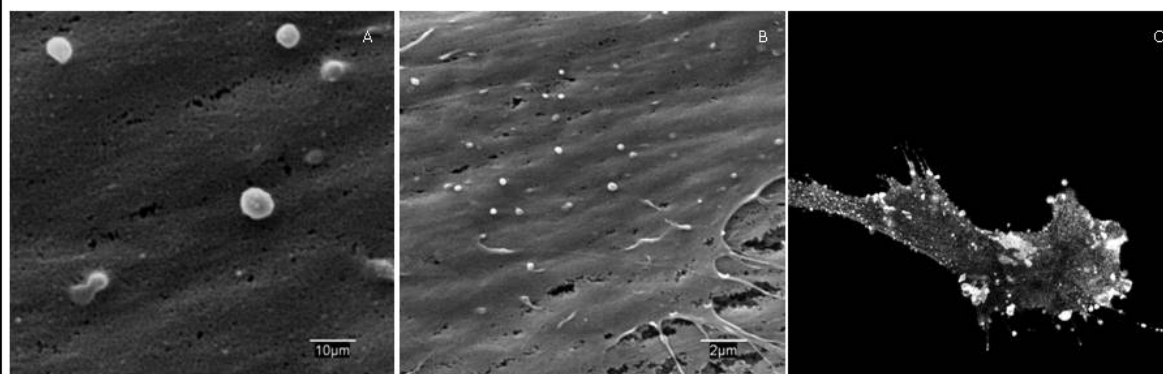


Figura 5. "Blebs" de hADSC en condiciones control. Las figuras A y B están realizadas por microscopía de scanning. La figura C es un marcaje fluorescente de O1 en microscopio confocal. Barra de escala 10 µm

Varias combinaciones de tratamientos tuvieron como resultado un incremento en el número de células mO1+. Antes de ser tratados con las combinaciones de factores de crecimiento y/o dbcAMP, los cultivos de ADSC fueron pretratados durante 3 días con ácido retinoico (RA). Dicho pretratamiento se llevó a cabo en dos condiciones: en medio con suero (α 20) o en medio definido (NBB27). Los grupos experimentales que fueron pretratados con RA en medio definido presentaron, en general un número 5-10 veces mayor de células mO1+ que los pretratados en medio con suero. El tratamiento inductor con dbcAMP produjo, por sí solo, un aumento del número de células mO1+, cosa que no ocurrió con ningún factor de crecimiento aislado. La inclusión de bFGF y EGF produjo un aumento adicional en el número de células mO1+, cuando el pretratamiento con RA se llevó a cabo en medio definido, siendo las combinaciones dbcAMP+ bFGF + EGF (AFE) y la de PDGF + dbcAMP + bFGF + EGF (PAFE) las más efectivas en este aspecto (Fig. 6). Estos aumentos se debieron a la inducción de la expresión de dicho marcaje, más que del mantenimiento del marcaje presente, ya que el cultivo partía de una situación en la que el número de células mO1+ era escaso. Los tratamientos se llevaron a cabo en pases tempranos del cultivo de las ADSC (1-3 semanas al inicio del experimento), aunque también se realizaron pruebas de tratamiento inductor en pases tardíos (>3 semanas) en los que se observó un incremento del número de células mO1+ sólo en algunos tratamientos que incluían PDGF, pero en estos cultivos no tuvo efecto inductor el dbcAMP (inserto en Fig. 6).

Contajes de mO1+

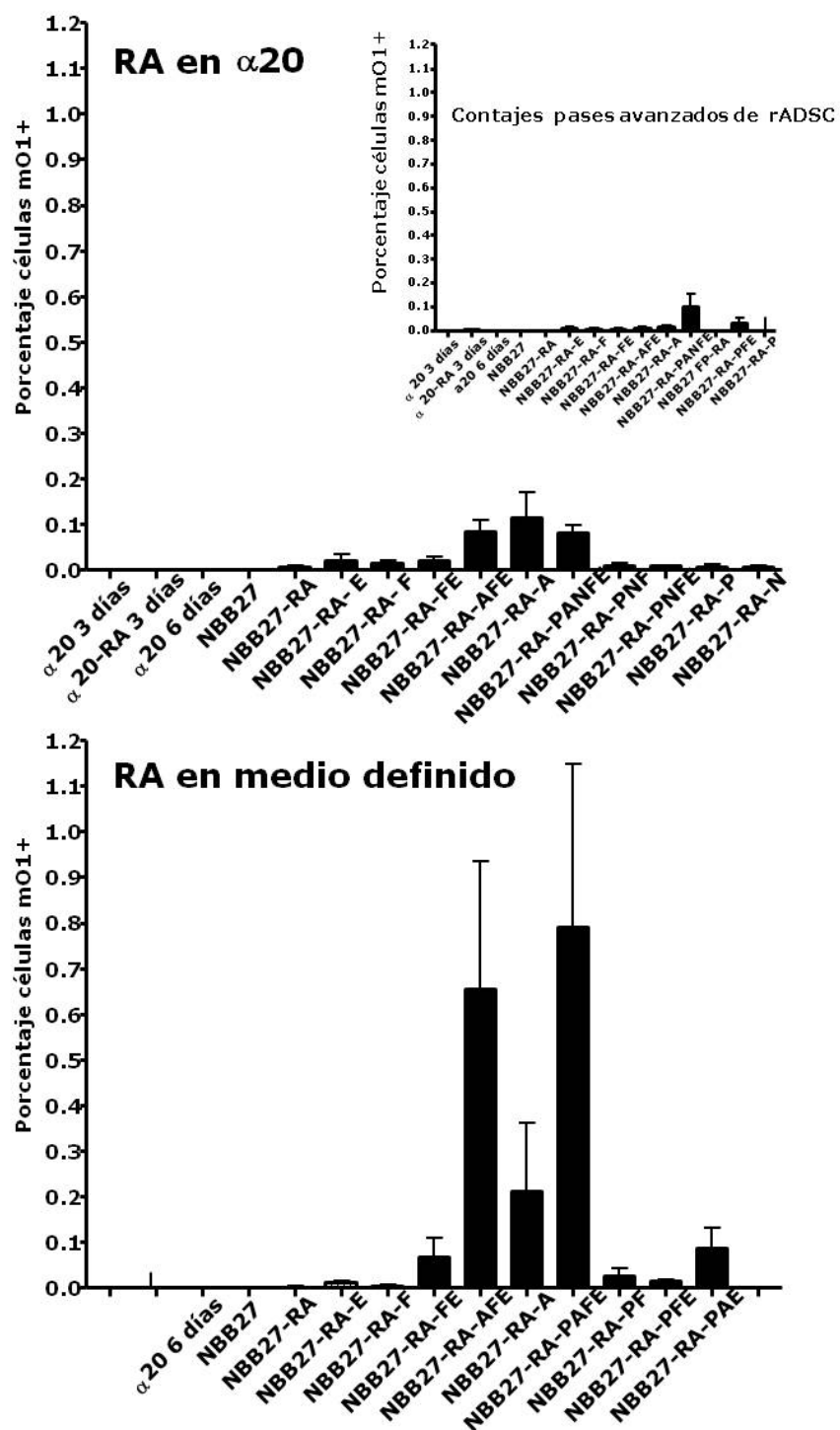


Figura 6. (página anterior) Número de células mO1+ en las distintas condiciones de cultivo en rADSC. Arriba, células pretratadas con RA en medio con suero, α 20; en el inserto se muestra el efecto de los tratamientos realizados en cultivos de pases tardíos (> 3 semanas). Abajo células pre-tratadas con RA en medio definido (NBB27). Los valores representan el porcentaje de células mO1+ con respecto al número total de células. α 20 3 días y α 20-RA 3 días: cultivos analizados al final del pretratamiento, sin o con RA, respectivamente; α 20 6 días: cultivo control, mantenido en α 20 hasta el final; NBB27 y NBB27-RA cultivos que no fueron tratados con factores, sin o con pretratamiento con RA, respectivamente. Con el fin de simplificar la visualización de los tratamientos, los factores incluidos en ellos se simbolizan con una letra: **P**: PDGF; **A**: dbcAMP; **N**: NT3; **F**: bFGF; **E**: EGF.

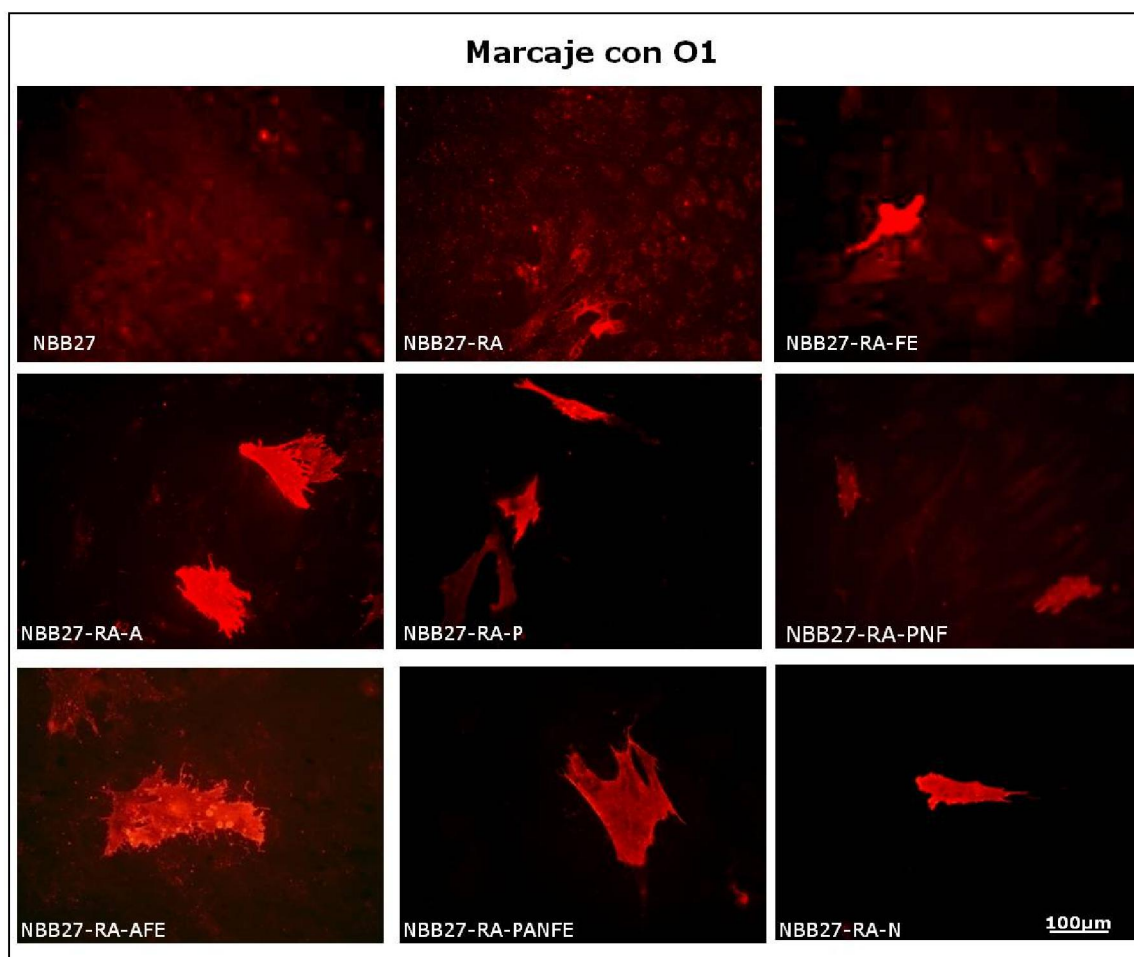


Figura 7. Efecto de la expresión de O1 con los distintos tratamientos (Pretratamiento RA en α 20) en rADSC. Con el fin de simplificar la visualización de los tratamientos, los factores incluidos en ellos se simbolizan con una letra: **P**: PDGF; **A**: dbcAMP; **N**: NT3; **F**: bFGF; **E**: EGF. Barra de escala: 100 μ m

La tinción membranal con O1 evidenció los cambios morfológicos que produjeron los tratamientos en las rADSC (Fig. 7-9). Los tratamientos que incluían dbcAMP produjeron células de cuerpo esférico con prolongaciones ramificadas y, en particular, la combinación de pretratamiento RA en medio definido/AFE llegó a producir células mO1+ morfológicamente parecidas a los oligodendrocitos (Fig. 9).

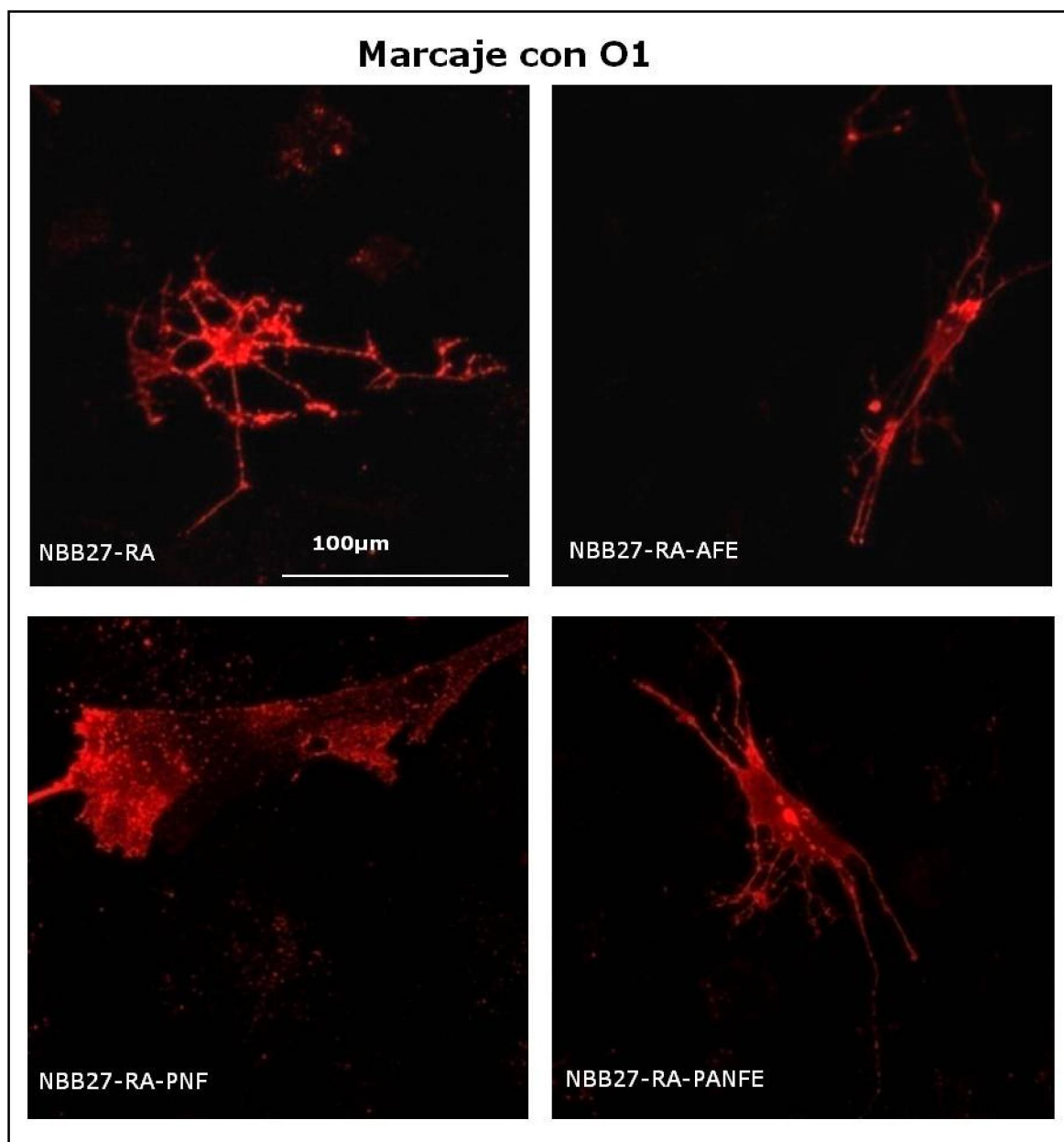


Figura 8. Efecto de la expresión de O1 con los distintos tratamientos (Pretratamiento RA en α 20) en rADSC. Imágenes de microscopía confocal. Con el fin de simplificar la visualización de los tratamientos, los factores incluidos en ellos se simbolizan con una letra: **P**: PDGF; **A**: dbcAMP; **N**: NT3; **F**: bFGF; **E**: EGF. Además de aumentar el número de células mO1+, en estas condiciones se generaban células ramificadas. Barra de escala 100 μ m

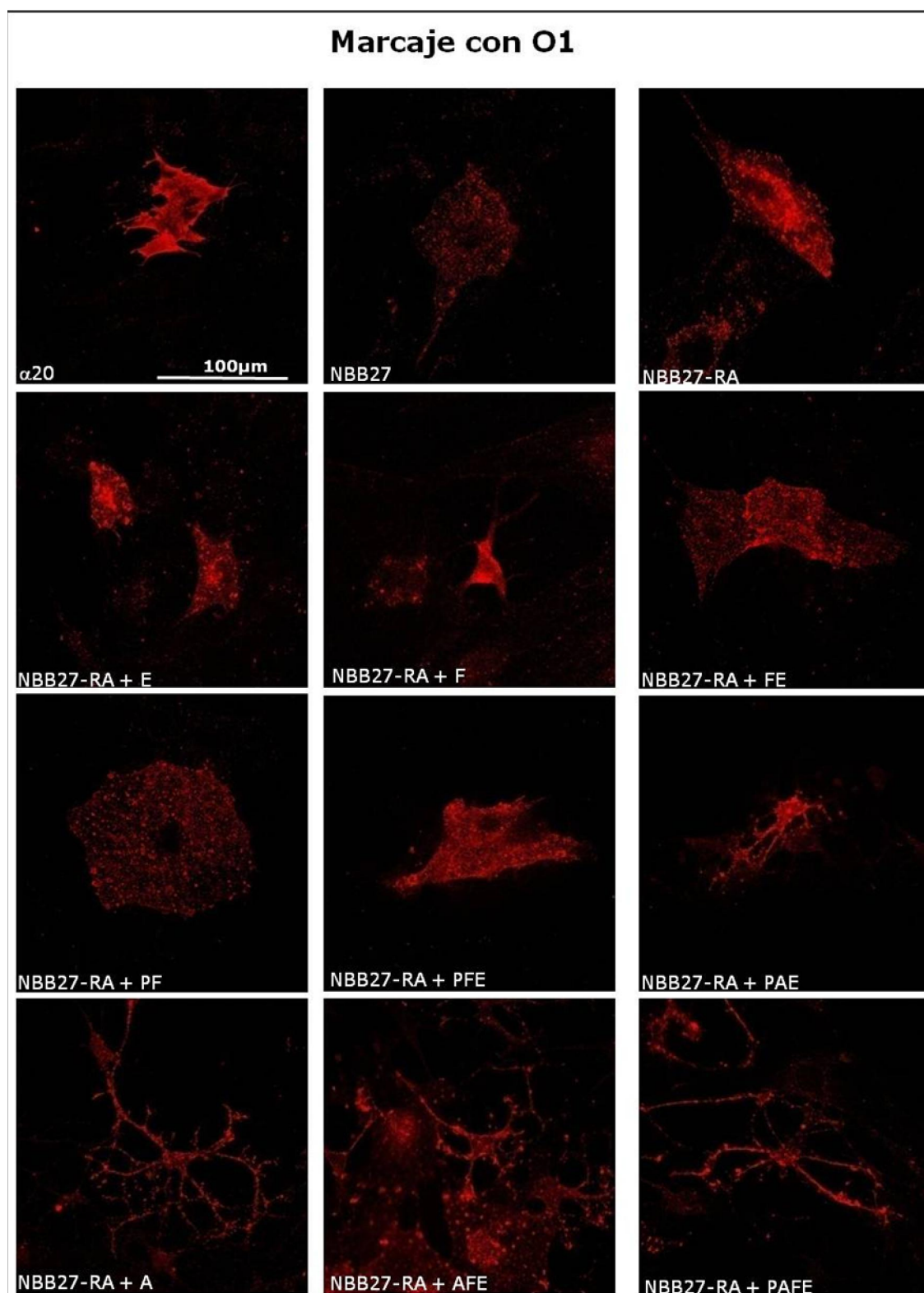


Figura 9. Efecto de la expresión de O1 con los distintos tratamientos (Pretratamiento RA en NBB27) en rADSC. Imágenes de microscopia confocal. Con el fin de simplificar la visualización de los tratamientos, los factores incluidos en ellos se simbolizan con una letra: **P**: PDGF; **A**: dbcAMP; **N**: NT3; **F**: bFGF; **E**: EGF. en la fila inferior se observan los distintos tipos morfológicos similares a oligodendrocitos obtenidos con estos tratamientos. Barra de escala: 100 µm

En el caso de las hADSC, no obtuvimos cambios cualitativos ni cuantitativos con los distintos tratamientos. Esto puede ser debido a que el medio de mantenimiento de estas células (MesenPro) está diseñado para la proliferación de las células mesenquimales. Se desconoce su composición, al tratarse de una fórmula bajo patente, pero es probable que entre los aditivos se encuentren factores utilizados en nuestros tratamientos, como el PDGF-BB y/o el bFGF, factores utilizados normalmente para la proliferación (Gong y cols., 2009).

b) Expresión de proteínas y péptidos propios de oligodendrocitos en rADSC

Como se ha dicho más arriba, en condiciones basales todas las células mostraron marcajes para MOG, Olig2 y CNPasa, (Fig. 2).

La adición al medio definido de combinaciones de diversos factores tróficos (EGF, FGF2, PDGF, NT3) y/o db-cAMP no produjo alteraciones significativas en la intensidad de la inmunotinción para Olig2 o MOG, aunque algunos tratamientos tuvieron efecto en la distribución intracelular del marcaje para Olig2 (nucleolos, núcleo y/o citoplasma). En particular, el tratamiento con la combinación PNF (y también el más completo PANFE) producían una tinción intensa de los nucleolos, mientras que el tratamiento con PDGF-BB solo producía una distribución difusa por el citoplasma (Figs. 10, 11 y 12).

También la inmunotinción para CNPasa mostró cambios en la distribución intracelular del marcaje. Así, mientras en condiciones basales la inmunotinción era preferentemente nuclear, con citoplasmas también positivos, pero menos marcados, tras el pretratamiento con RA la tinción se intensificaba en el núcleo, pero el tratamiento con AFE producía una distribución difusa por toda la célula (Fig. 13). Desconocemos el significado de estos cambios de localización intracelular del inmunomarcaje, tanto del Olig2 como de la CNPasa. La combinación de los factores se fue realizando a medida que observábamos su influencia en los sucesivos experimentos, no sólo de inmunotinción sino también de ensayo bioquímico. Por este motivo, los tratamientos que incluían NT3 fueron descartados tras los primeros experimentos en los que no se obtuvo ningún efecto observable con este factor (Figs. 10,11 y 12).

Marcaje con Olig2

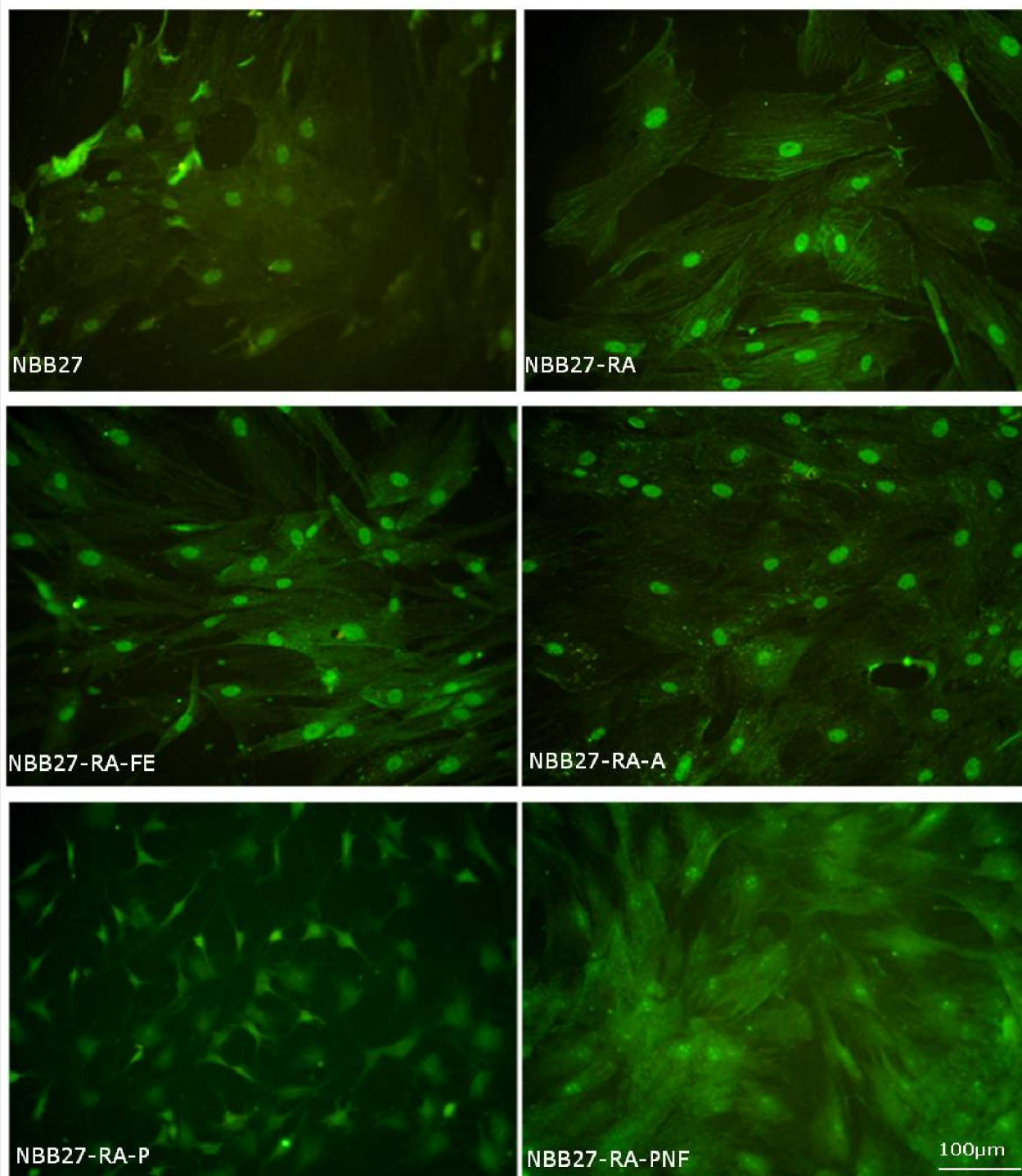


Figura 10. Efecto de la expresión de Olig2 en los distintos tratamientos (Pretratamiento RA en $\alpha 20$) en rADSC. Con el fin de simplificar la visualización de los tratamientos, los factores incluidos en ellos se simbolizan con una letra: **P**: PDGF; **A**: dbcAMP; **N**: NT3; **F**: bFGF; **E**: EGF. Barra de escala: 100 μ m

Marcaje con MOG

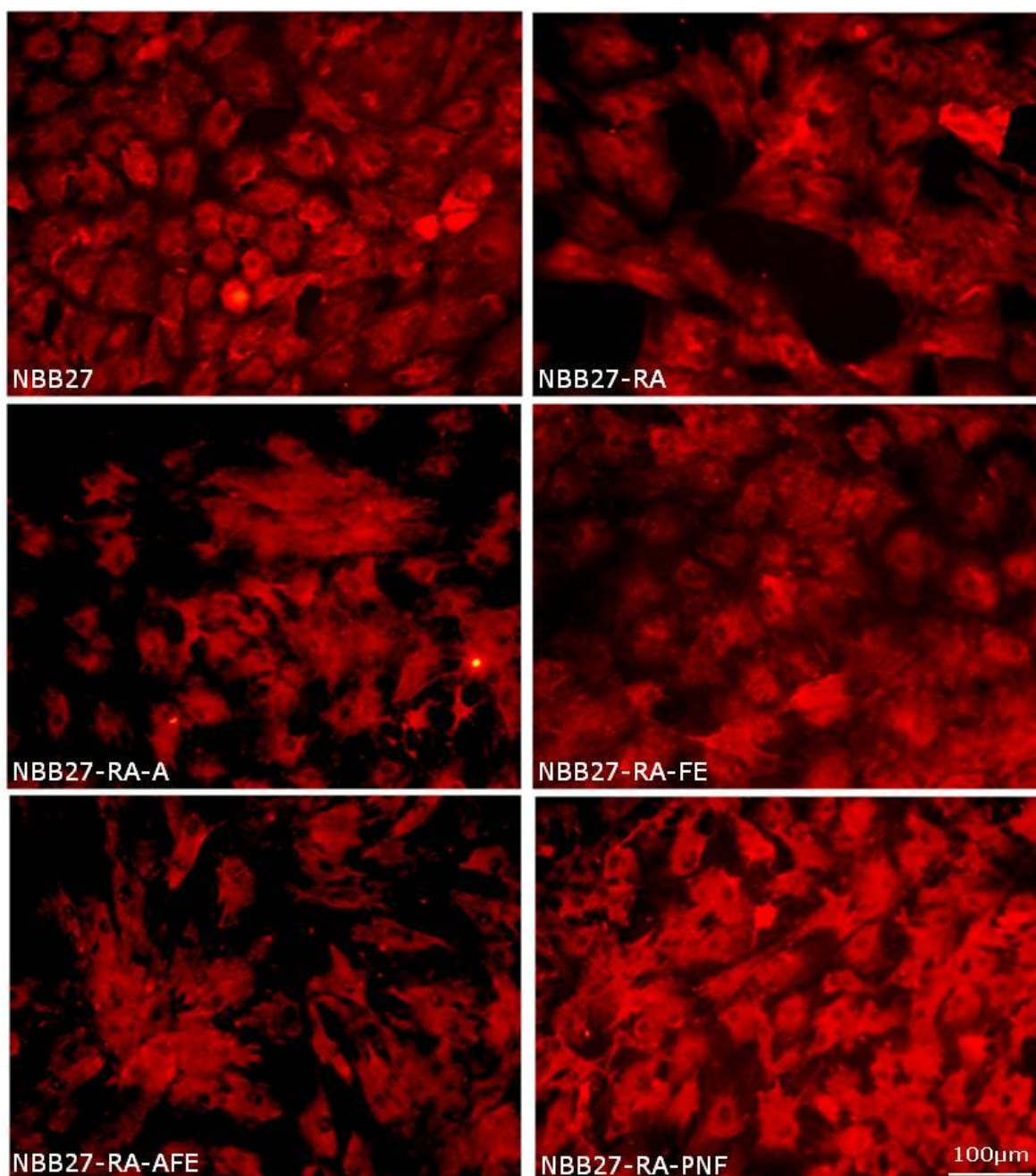


Figura 11. Efecto de la expresión de MOG en los distintos tratamientos (Pretratamiento RA en $\alpha 20$) en rADSC. Con el fin de simplificar la visualización de los tratamientos, los factores incluidos en ellos se simbolizan con una letra: **P**: PDGF; **A**: dbcAMP; **N**: NT3; **F**: bFGF; **E**: EGF. Barra de escala: 100 µm

Marcaje con CNPasa

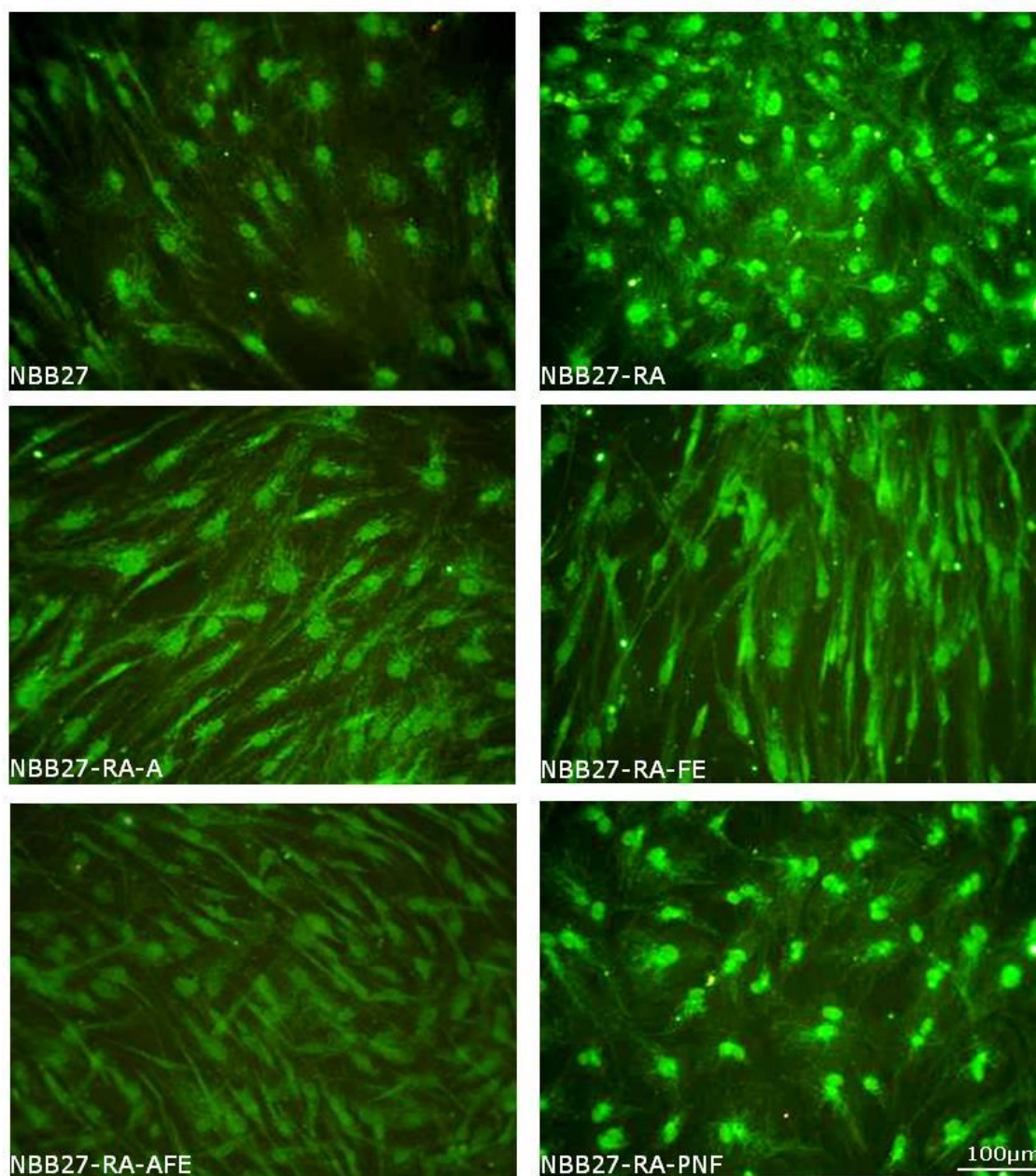


Figura 12. Efecto de la expresión de CNPasa en los distintos tratamientos (Pretratamiento RA en $\alpha 20$) en rADSC. Con el fin de simplificar la visualización de los tratamientos, los factores incluidos en ellos se simbolizan con una letra: **P**: PDGF; **A**: dbcAMP; **N**: NT3; **F**: bFGF; **E**: EGF. Barra de escala: 100 μ m

1.1.2. Caracterización de las rADSC por *western blot*

Se realizaron análisis del contenido proteico de las ADSC por *western blot*, utilizando los mismos anticuerpos con los que se había realizado la inmunotinción, para comprobar el tamaño de las proteínas marcadas y la especificidad de la inmunotinción

En las células en condiciones basales en medio de mantenimiento, estos análisis mostraron bandas reactivas para Olig2, CNPasa y MOG, así como para Sox-10, a la misma altura que en progenitores de oligodendrocitos de rata utilizados como control positivo. Las bandas obtenidas con el anticuerpo para MBP fueron muy tenues, tanto en ADSC de rata como en las humanas pero se localizaron tanto a la altura de la isoforma Golli como de las isoformas de la mielina (Fig. 13).

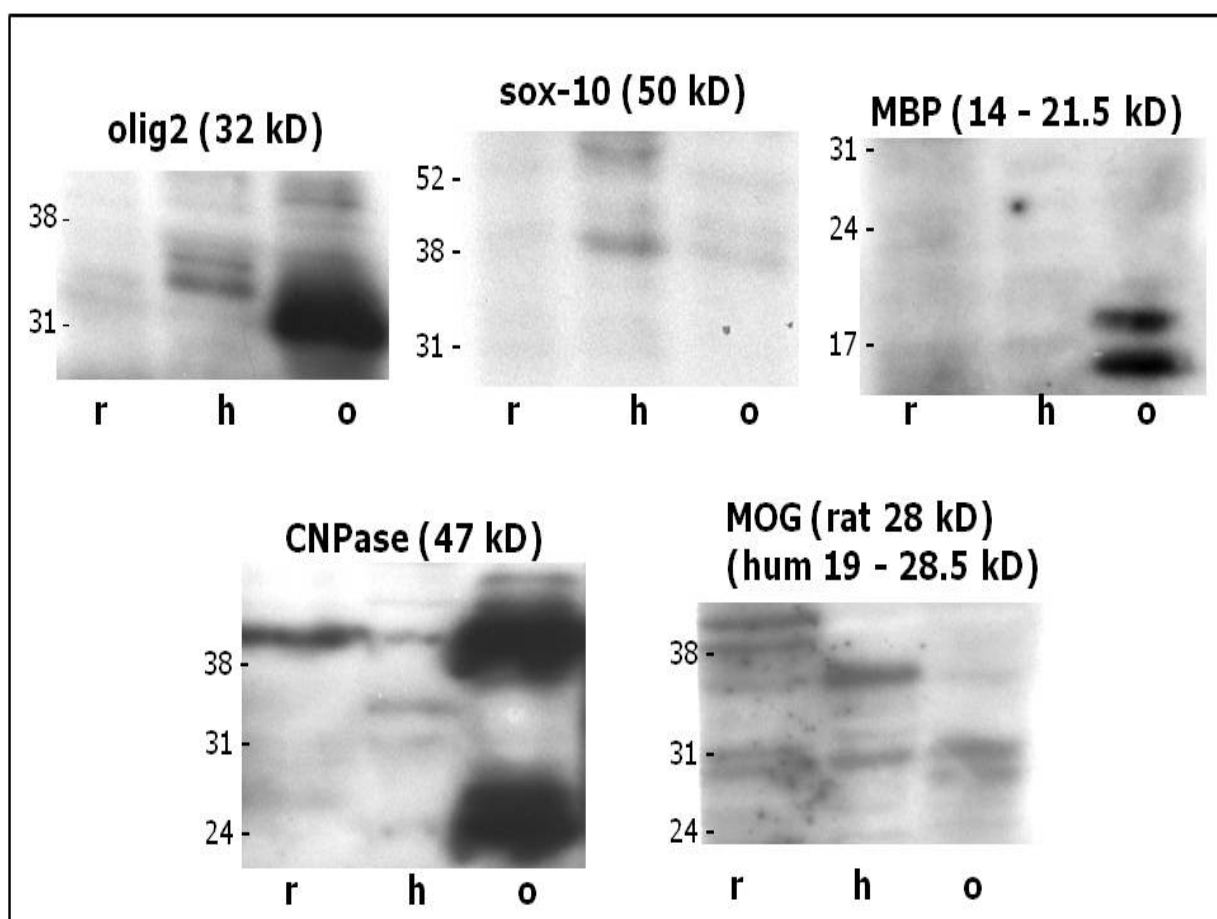
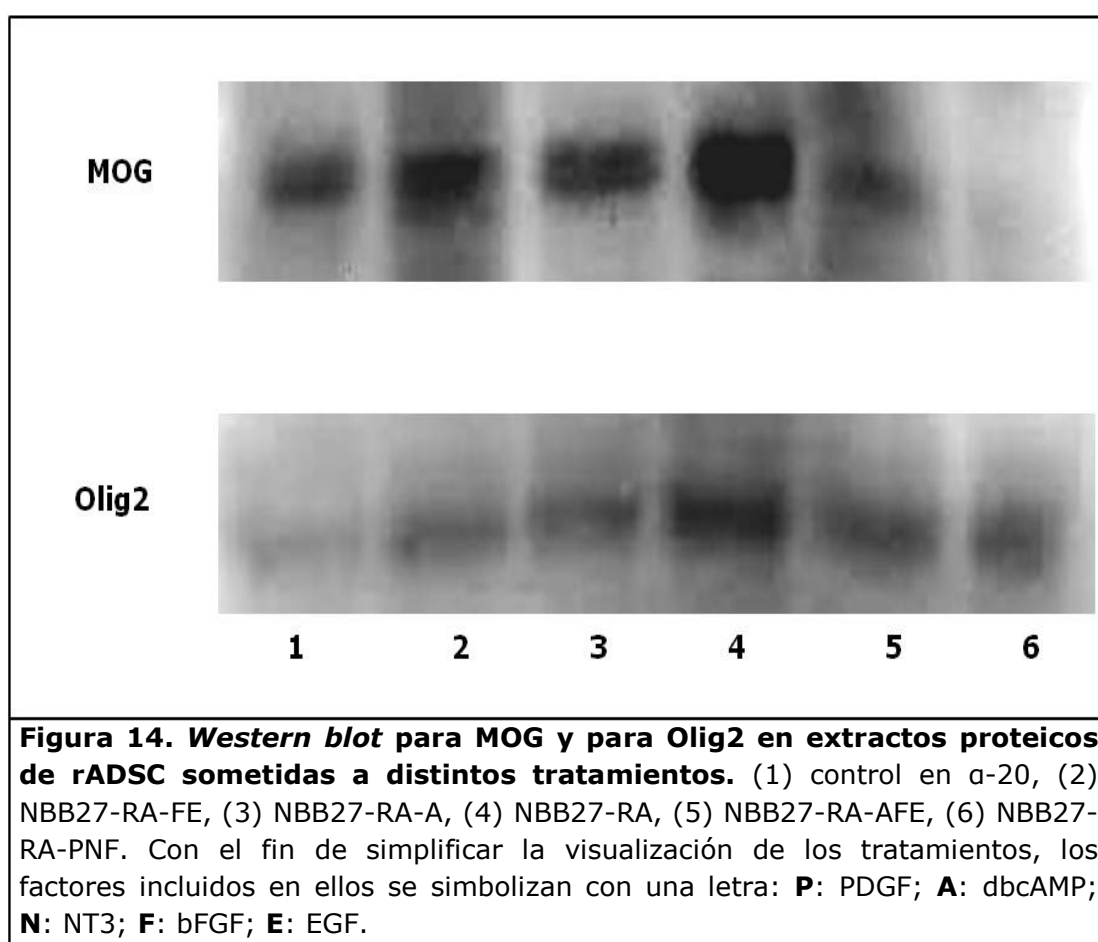


Figura 13. Imagen de western blot de las ADSC en condiciones basales. En todas las imágenes se observa la banda de rADSC, la banda de ADSC en células humanas y por último la banda oligodendrocitos como control positivo de los anticuerpos. **r** corresponde a proteínas de células mesenquimales de rata, **h** corresponde a proteínas de células mesenquimales humanas y **o** corresponde a proteínas de oligodendrocitos de rata en cultivo

Los diferentes tratamientos inductores produjeron una disminución notable de las proteínas analizadas, que quedaron por debajo de nuestro umbral de detección, excepto en el caso de MOG y Olig2. En la figura 13 se muestra el western blot para estas proteínas de células mantenidas en diferentes condiciones. Un análisis semicuantitativo nos sugiere que el tratamiento con ácido retinoico en medio α 20 durante 3 días, seguido de mantenimiento en medio definido NBB27 produce un notable aumento en la expresión tanto de MOG como de Olig2. La adición de factores tróficos y/o dibutilil cAMP hace que este aumento de expresión sea menor o incluso que disminuya el MOG. Resulta sorprendente que la variación en la expresión de MOG parezca ir en sentido contrario a la inducción de marcaje con O1. La variación de la expresión de Olig2 parece más difícil de valorar, ya que en todos los casos se aprecian incrementos con respecto a los niveles en medio control de mantenimiento, probablemente como resultado del pretratamiento con ácido retinoico (Fig.14).



1.1.3. Caracterización de las rADSC por RT-PCR

La expresión de estas proteínas se verificó mediante RT-PCR, donde se pudo observar la presencia en las ADSC de rata del mRNA para PLP1/DM20, CNPasa, MOG, MBP, Sox-2, Sox-10, Slug y Olig-2 (Fig. 15). Además, como se aprecia en la tabla de material y métodos, la expresión de MBP, CNPasa, Olig2 y Sox-10 se comprobó con 2 combinaciones diferentes de primers. Esto supone una confirmación de la expresión de estos marcadores oligodendrogliales en las ADSC de rata en condiciones basales de cultivo. La expresión de esos mRNAs fue, sin embargo más baja que la presente en corteza de rata postnatal, excepto para la CNPasa. La expresión de Sox-10, sugerida por el análisis de western blot, pero no demostrada por inmunotinción, queda aquí confirmada.

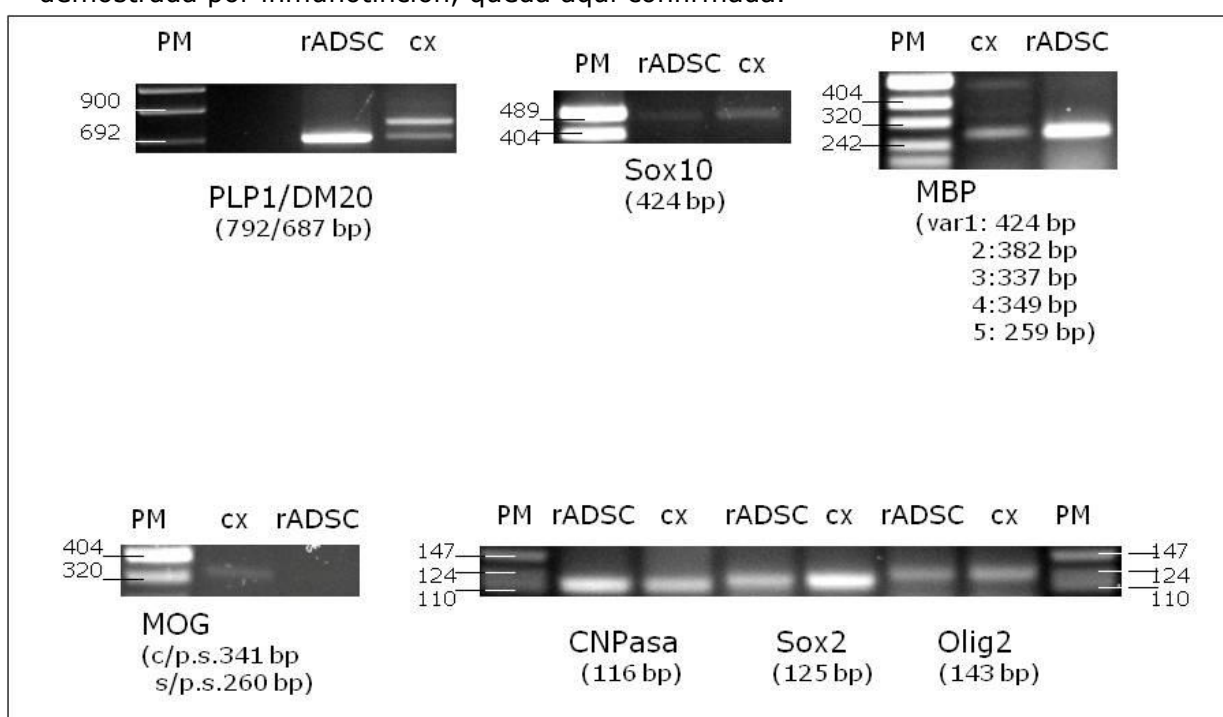


Figura 15. PCR-RT de diversos mRNA característicos de oligodendrocitos en corteza de rata postnatal (cx) y ADSC de rata en condiciones basales. Imagen negativa de la tinción con Gelstar. Con una marca se indica la altura esperada de la banda de cDNA. Entre paréntesis se indica el tamaño de los los amplicones de PCR esperables para las distintas variantes. PM: marcador de peso molecular.

Resulta sorprendente que todos los genes implicados en la mielina del sistema nervioso central que hemos analizado (MBP, PLP/DM20, MOG, CNPasa) se expresen en las ADSC de rata, ya que estas células no tienen una función equiparable ni presentan una morfología asimilable *in vivo* ni en cultivo a las células mielinizantes. Además, nuestros análisis por RT-PCR muestran que el RNA de MOG se transcribe con su péptido señal, que es la porción de la proteína que lo dirige

hacia la membrana; el MBP (no Golli) se expresa principalmente en su variante 3 (de 18,5 kDa), que es la más común en la corteza de rata postnatal (Padhi y Pelletier, 2012); el PLP/DM20 se expresa principalmente en su isoforma DM20.

1.2. Estudio de la mielinización en cultivo: co-siembra sobre cultivos de neuronas de ganglios de las raíces dorsales

Mediante este procedimiento se intenta demostrar si las células obtenidas mediante inducción farmacológica de fenotipo oligodendroglial son capaces de mielinizar los axones, como prueba de concepto de que el cambio fenotípico obtenido es funcional y por lo tanto se podría considerar que se han generado auténticos oligodendrocitos.

Los experimentos de co-cultivo se realizaron sobre neuronas de ganglio de las raíces dorsales (DRGn) purificadas (depletadas de células de Schwann y fibroblastos proliferantes tras tratamiento con antimitóticos). Las DRGn producen largos axones de calibre superior a 1 μm que son fácilmente mielinizados en cultivo tanto por células de Schwann como por oligodendrocitos

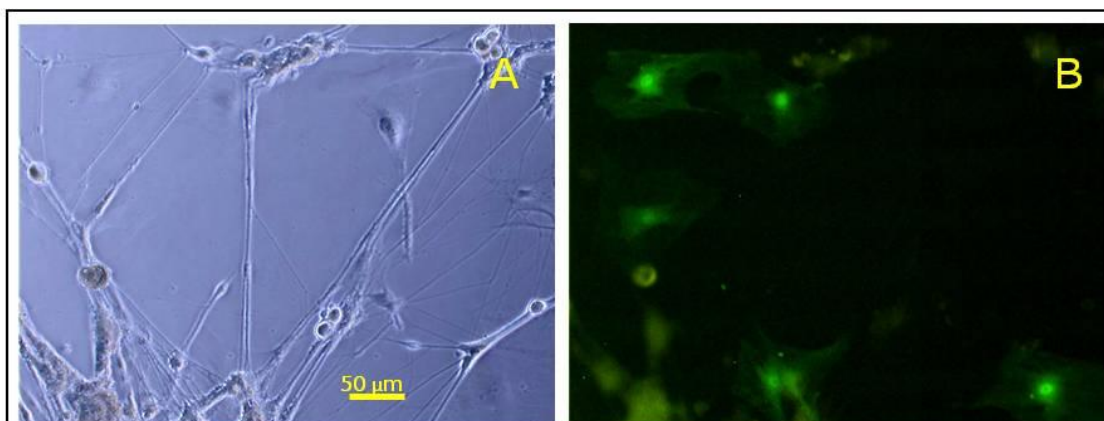


Figura 16. Cocultivo de rADSC con DRGn. Las rADSC fueron transducidas previamente para expresar proteína fluorescente verde (GFP). Imagen tomada tras 3 semanas de cocultivo mostrando en el mismo campo del cultivo el contraste de fase (A) y la imagen fluorescente (B) *in vivo*. No se apreciaron células marcadas en verde que extendieran su citoplasma a lo largo de los axones de las DRGn, por lo que no se demuestra que estas células tengan capacidad de mielinización.

Los co-cultivos realizados no han permitido demostrar mielinización de axones a cargo de las rADSC en ninguna de las condiciones probadas (Fig. 16). En cambio, cocultivos con progenitores de oligodendrocitos obtenidos de corteza fetal de rata, utilizados como control positivo de la técnica, mostraron extensiones periaxoniales marcadas con O1, indicativas de mielinización. Nuestros estudios, por lo tanto, no permiten demostrar que las rADSC, tanto en condiciones basales como

tras la aplicación de tratamientos diferenciadores que producen cambio morfológico con aumento de la expresión de galactocerebrósido, sean capaces de actuar funcionalmente como oligodendrocitos a pesar de que expresan una amplia variedad de moléculas propias de estas células.

2. Transdiferenciación de células mesenquimales a oligodendrocitos mediante reprogramación directa

Como acabamos de mostrar, la inducción farmacológica no consiguió generar células que fueran capaces de mielinizar, por lo que no se podían considerar como auténticos oligodendrocitos. Recientemente, dos publicaciones simultáneas han propuesto que se pueden generar progenitores de oligodendrocitos, y de éstos oligodendrocitos con capacidad para mielinizar, a partir de otras células somáticas mediante la sobreexpresión de 3 factores de transcripción, Sox10, Olig2 y Nkx6.1 en un caso (Najm *y cols.*, 2013) y Sox10, Olig2 y Zfp536 en el otro (Yang *y cols.*, 2013). Basándonos en estos trabajos, hemos intentado transdiferenciar las rADSC hacia oligodendrocitos funcionales mediante reprogramación directa por factores de transcripción.

2.1 Constructos genéticos para la reprogramación

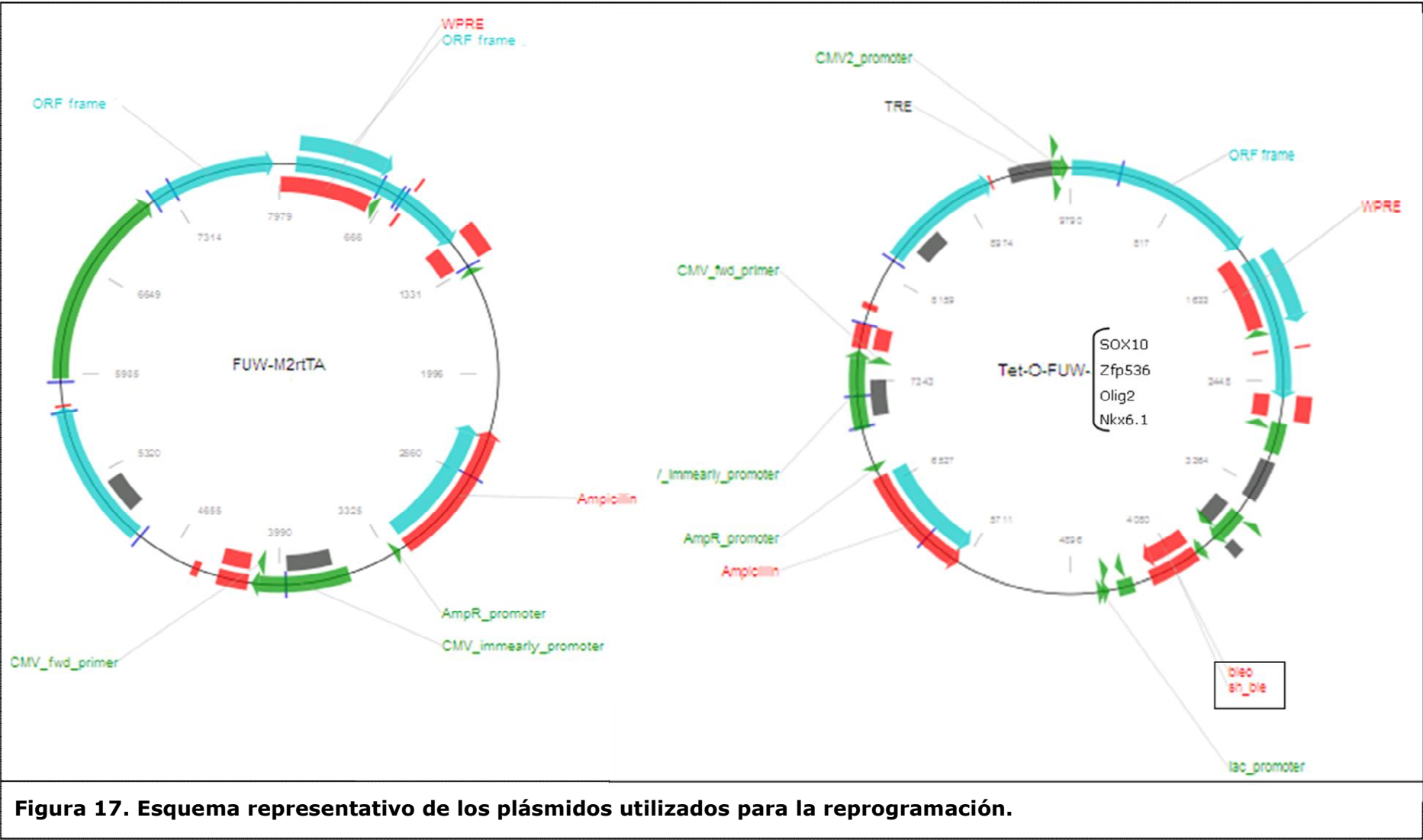
Los plásmidos lentivirales que contenían los factores de transcripción de expresión condicional Tet-O-FUW-Olig2, Tet-O-FUW-Zfp536, Tet-O-FUW-Nkx6.1 y Tet-O-FUW-Sox10, producidos por el laboratorio de Marius Wernig, que lideraba uno de los grupos arriba citados (Yang *y cols.*, 2013), fueron obtenidos en Addgene. Estos 4 plásmidos se componen de un esqueleto FUW, en el que está incluido un promotor mínimo de CMV (citomegalovirus) activado por un transactivador. Este promotor tiene un TRE (elemento de respuesta de tetraciclina) que responde a la unión de la proteína transactivadora tTA con tetraciclina o su análogo doxiciclina, induciendo expresión del gen o genes aguas abajo (*downstream*) del promotor. La tTA ha de expresarse en un segundo plásmido FUW-M2rtTA, que ha de ser cotransducido. Además, el esqueleto FUW contiene un gen Amp (ampicilina) de selección en procariotas y otro, sh_ble, que confiere la resistencia al antibiótico zeocina (bleomicina/fleomicina) en eucariotas (Fig. 17). El plásmido lentiviral FUW-M2rtTA, que permite la expresión del transactivador, así como otro constructo inducible, FUW-Tet-O-eGFP para la expresión de la proteína fluorescente verde, que se utilizó como control de las transducciones, como control negativo de

la reprogramación o para el marcaje de células con fluorescencia, fueron obtenidos también de Addgene y procedían del mismo laboratorio.

Para el manejo más sencillo de las distintas combinaciones de factores de transcripción hemos utilizado acrónimos en los que la transducción de Sox10, se abrevia con **S**, la transducción de Olig2 con **O**, la transducción de Zfp536 con **Z** y la transducción de Nkx6.1 con **N**. En todos los casos, las células se transducen también con M2rtTA por lo que no lo incluimos en el acrónimo.

Se utilizó inicialmente una multiplicidad de infección (MOI) de una partícula lentiviral/célula, intentando que las células no tuvieran múltiples copias de un mismo transgen. Sin embargo, esto no dio resultado, por lo que optamos por un MOI de 5 partículas lentivirales/célula. En los ensayos con hADSC utilizamos un MOI de 10 partículas/célula.

En algunas ocasiones las células reprogramadas fueron coinfectadas con lentivirus de genes reporteros fluorescentes, MBPp-LeGO-Ckras (reportero fluorescente rojo con afinidad por membranas bajo el promotor de MBP) o GFAPp-LeGO-Gkras (reportero fluorescente verde con afinidad por membranas bajo el promotor de GFAP). Esto tenía el objetivo de marcar la aparición de fenotipos oligodendrogiales (en base a la activación del promotor de MBP en estas células) o astrogiales (en base a la activación del promotor de GFAP). Estos reporteros, sin embargo, no cumplieron la función deseada pues la transducción fue poco estable, perdiéndose con el tiempo en cultivo, y para el momento en que las células mostraban signos de transdiferenciación había ya muy pocas células que expresaran dichos transgenes. Finalmente, decidimos abandonar este tipo de vectores lentivirales. Por ello, se utilizó el vector lentiviral FUW-Tet-O-eGFP (vector condicional que expresa proteína fluorescente verde cuando se induce con doxiciclina) como marcador, tal como se menciona más arriba.



2.2 Transdiferenciación de las células mesenquimales

Las primeras pruebas realizadas mostraron que la combinación más eficiente de factores de transcripción en rADSC fue SOZ. En el caso de las hADSC, sin embargo, los experimentos en marcha muestran que la combinación SON parece ser más efectiva.

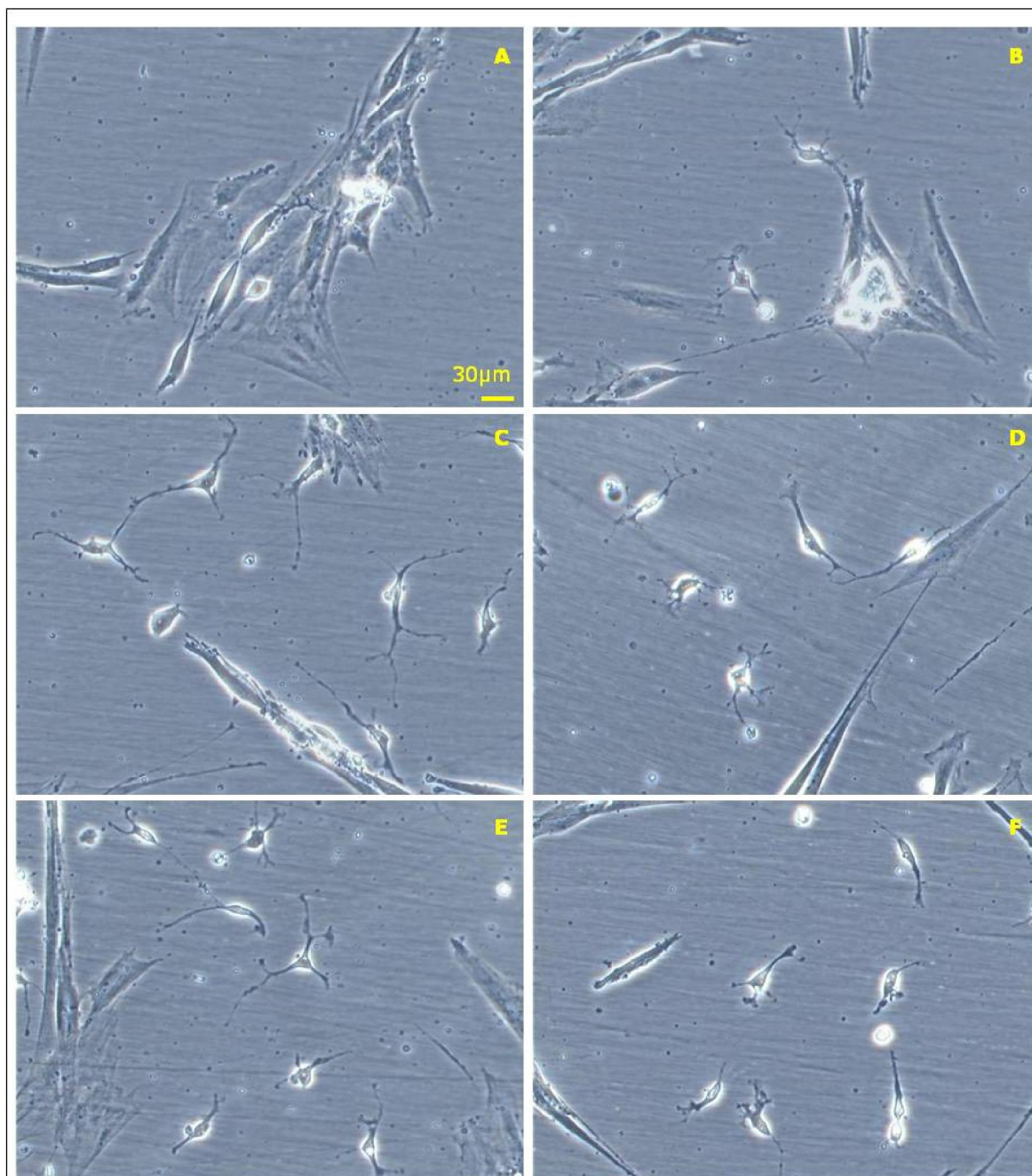


Figura 18. Primeros estadios de la transdiferenciación de rADSC-SOZ. A y B. Aparición de células refringentes, algunas con ramificaciones C. Primeras células aisladas, D. Formación de la primera colonia, E. Crecimiento de una colonia, F. Colonia establecida. Barra de escala 30 μm .

En períodos variables de tiempo tras el inicio de la inducción con doxíciclina, nunca inferiores a 3 semanas, se observaron las primeras células de morfología similar a oligodendrocitos inmaduros, refringentes y de pequeño tamaño, con dos o más prolongaciones cortas y ramificadas. Estas células se localizaban sobre otras de aspecto más mesenquimal, aplanado y poligonal, o en el borde de las colonias que éstas formaban (Fig. 18 A y B).

Posteriormente, estas células se dividían, formando al cabo de 1-2 semanas colonias de unas 5 o 6 células separadas de las células de tipo mesenquimal (Fig. 18 C y D). Según maduraba el cultivo, las colonias llegaban a tener 20 células o más. Manteniéndolas en el medio de proliferación estas células llegaban a constituir la mitad de la población del cultivo al cabo de 6 semanas aproximadamente (Fig. 18 E y F). Estos cultivos se podían subcultivar, utilizando Accutase para despegarlos, con el fin de seguir expandiendo las células o para realizar análisis fenotípicos mediante inmunofluorescencia y técnicas de biología molecular, o para estudiar la mielinización en cultivo sobre neuronas de ganglios de las raíces dorsales.

Las rADSC transducidas con la combinación SONZ de factores de transcripción sólo generaron células de morfología refringente y ramificada, pero no llegaron a producir colonias aisladas de células de tipo oligodendrocito. Además, como se verá más adelante, estas células ramificadas tampoco presentaron inmunomarcaje con O4, por lo que no se pueden considerar como progenitores de oligodendrocitos, a pesar de su aspecto. La combinación SON no llegó a generar células refringentes ramificadas, lo cual no deja de ser curioso pues fue la combinación más eficiente para reprogramar ADSC humanas. En el caso de las células transducidas con la combinación OZ o en las transducidas con Olig2 solamente, después de dos meses de cultivo, no se produjo cambio morfológico aparente (Fig. 19).

Las células transdiferenciadas podían ser mantenidas en congelación y resemebradas sin perder su potencial oligodendrocítico y se podían mantener en continua expansión durante al menos 7 meses.

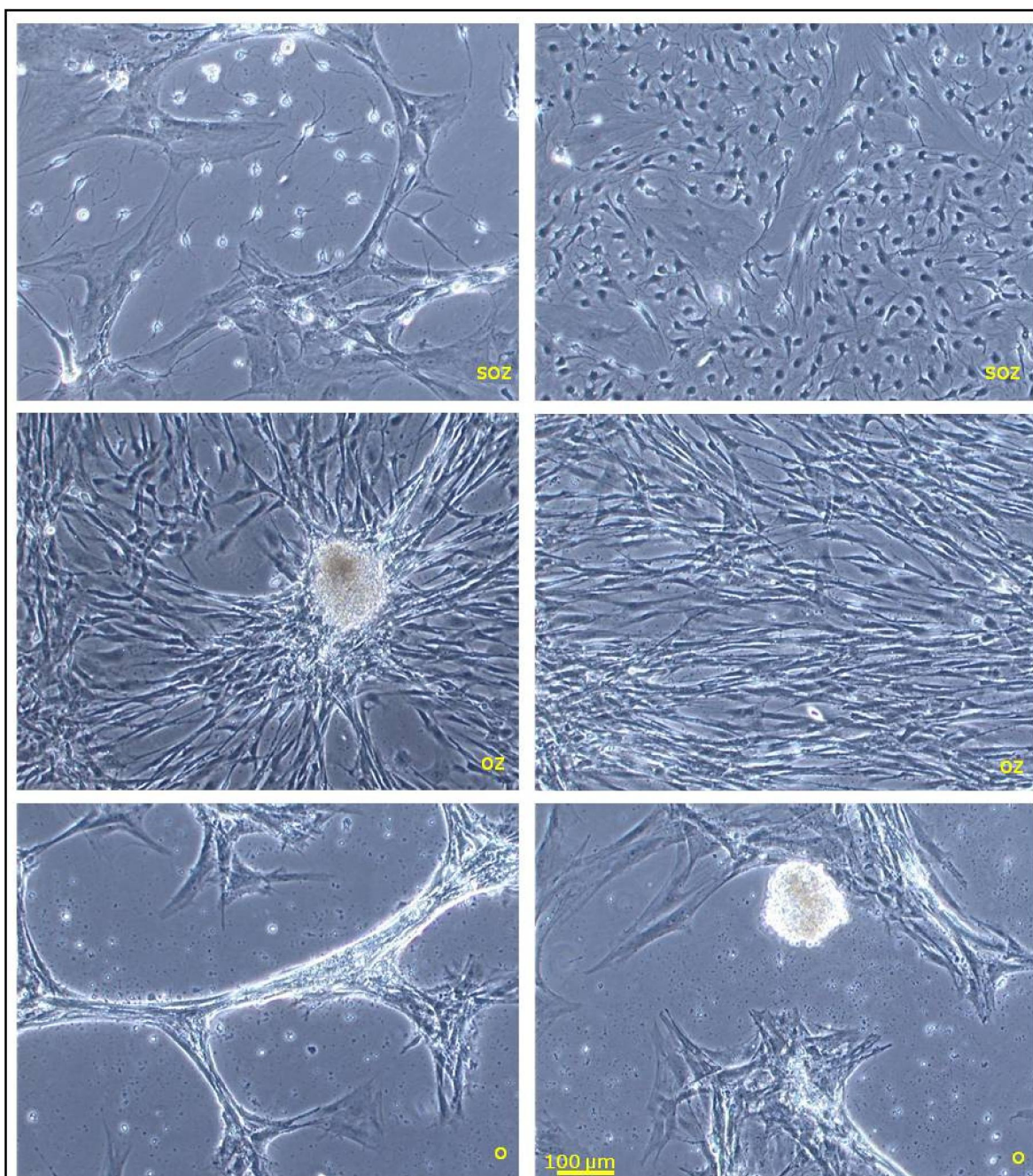


Figura 19. Comparación de células reprogramadas con distintas combinaciones a un mes y medio de activación. Dos campos por cada combinación de factores de transcripción. Estas células no fueron pre-tratadas. Barra de escala: 100μm

2.3 Pretratamientos para favorecer la transdiferenciación

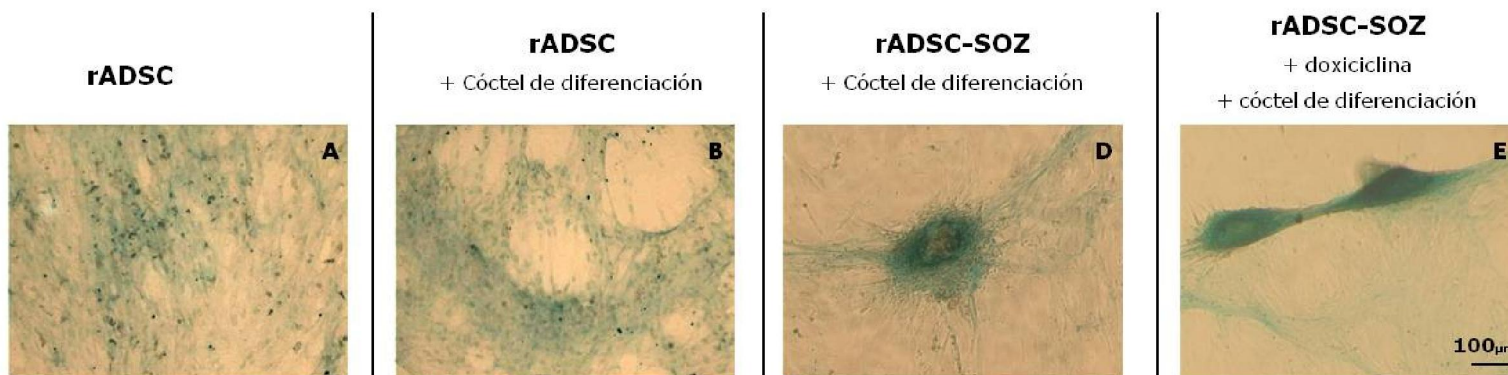
Nos planteamos comprobar si la transducción de la rADSC con los factores de transcripción capaces de reprogramar estas células mesenquimales hacia un fenotipo oligodendroglial alteraba la vía natural de diferenciación de dichas células

hacia adipocitos, condrocitos u osteocitos. Para ello, sometimos a cócteles de inducción adipogénica, condrogénica u osteogénica las rADSC en 3 condiciones diferentes: a) rADSC en cócteles de diferenciación mesodérmica, b) rADSC transducidas con SOZ, pero sin activar los transgenes con doxiciclina, en cócteles de diferenciación, o c) rADSC transducidas con SOZ y activadas con doxiciclina, en cócteles de diferenciación. Este experimento nos demostró que cuando las rADSC han sido transducidas con los transgenes SOZ y se tratan con el cóctel condrogénico producen mayores agregaciones de células positivas para GAGs que cuando no han sido transducidas (Fig. 20). Incluso cuando los transgenes no son activados con doxiciclina, hay una mayor diferenciación condrogénica. Esto es probablemente debido a que se produce una expresión de bajo nivel de los transgenes inducibles (lo que se conoce como “*leak*” o escape) aún en ausencia de doxiciclina. La diferenciación osteogénica, por el contrario, parecía inhibida cuando las células sobreexpresaban los transgenes SOZ (Fig 20). La diferenciación adipogénica (no mostrada aquí pues las células adiposas terminaban despegándose del sustrato) también se vio inhibida en las rADSC transducidas que expresan SOZ.

Nos planteamos entonces la hipótesis de que, en las rADSC, la sobreexpresión de Sox10 podría estar activando genes que responden al factor de transcripción básico para la condrogénesis Sox9, (pues ambos pertenecen a la familia SoxE y se unen a motivos de ADN similares), activando la vía condrogénica en las células mesenquimales. Esto nos llevó a considerar la posibilidad de utilizar tratamientos previos a la inducción de los transgenes, con el fin de evitar la vía condrogénica, y así mejorar cuantitativa o cualitativamente la eficiencia de la transdiferenciación de las rADSC.

Condrogénesis

Azul Alcian



Osteogénesis

Rojo de Alizarina

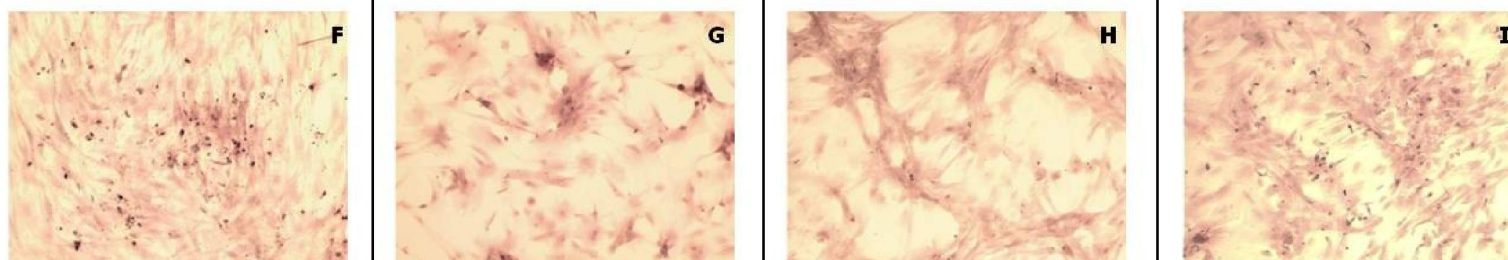
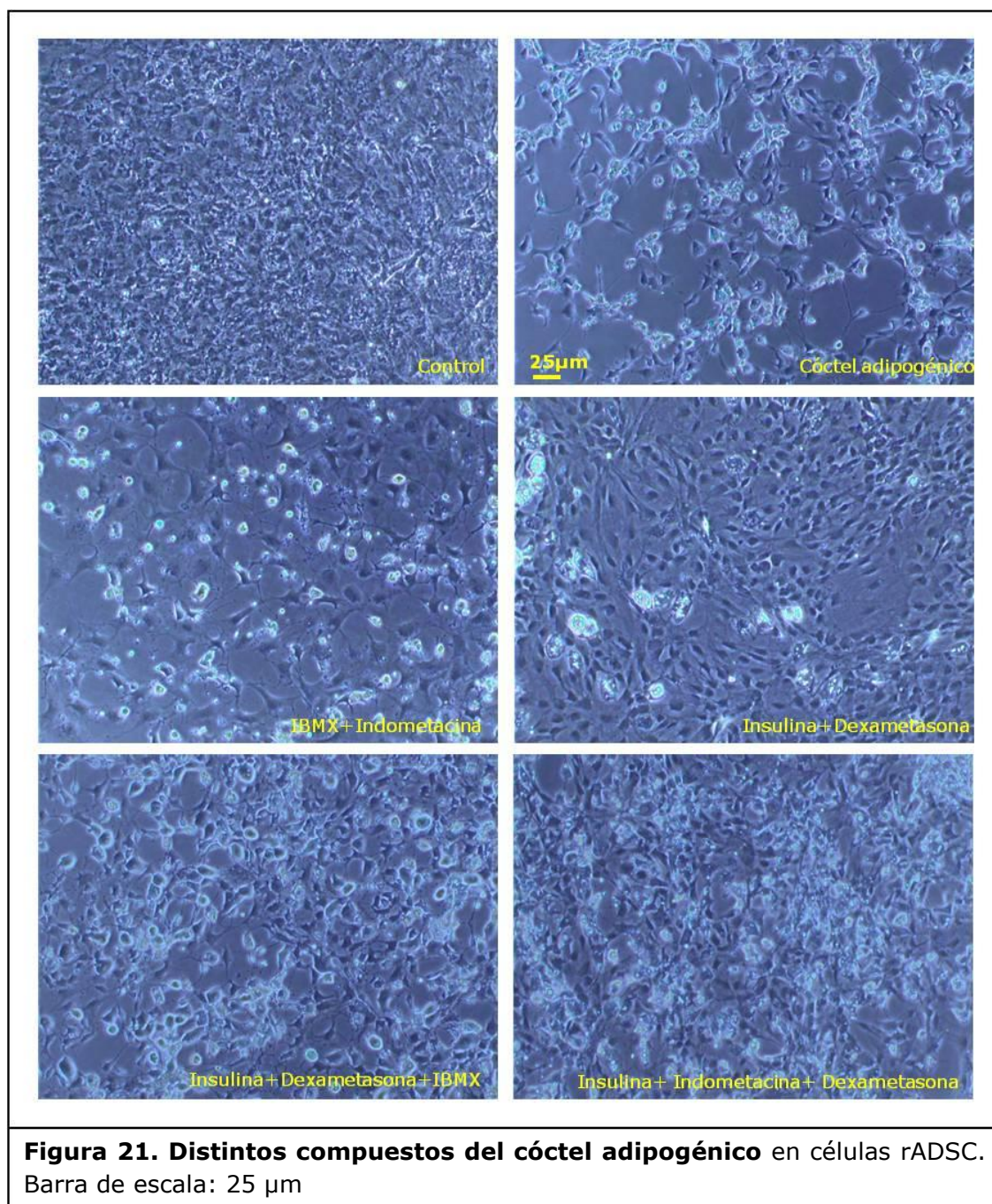


Figura 20. Células mesenquimales de rata en distintas condiciones de diferenciación. A y F: rADSC mantenidas 21 días en medio D10; B y G: rADSC tratadas con el cóctel condrogénico y osteogénico respectivamente; D y H: rADSC transducidas con SOZ y posteriormente tratadas con cóctel condrogénico y osteogénico respectivamente; E y I: rADSC transducidas con SOZ y posteriormente tratadas con cóctel condrogénico y osteogénico respectivamente y activadas con doxiciclina. Barra de escala: 100 μ m

2.3.1 Fundamento de los pretratamientos utilizados

a) Adipogénico

Se realizó el pretratamiento que denominamos “adipogénico” (que simbolizamos con una “a” tras la combinación de transgenes), utilizando componentes del cóctel que comúnmente se utiliza para la diferenciación adipogénica de las células mesenquimales, con la intención de retirar a las células mesenquimales de la vía condrogénica. Se hicieron pruebas utilizando los distintos



componentes del cóctel adipogénico (IBMX, indometacina, dexametasona e insulina) por separado o en combinaciones. Con ello pudimos comprobar que la

combinación de IBMX con indometacina era capaz de producir el cambio morfológico que observamos con el cóctel completo (Fig. 21). Este cambio se produce debido a que el IBMX actúa aumentando el AMP cíclico intracelular mediante la inhibición de la fosfodiesterasa y la indometacina potencia la actividad del IBMX a través de la vía de la ciclooxigenasa (Ying y cols., 2012). En las rADSC tratadas con dbcAMP se produce un cambio morfológico similar al que obtenemos con el IBMX y la indometacina (Fig 21).

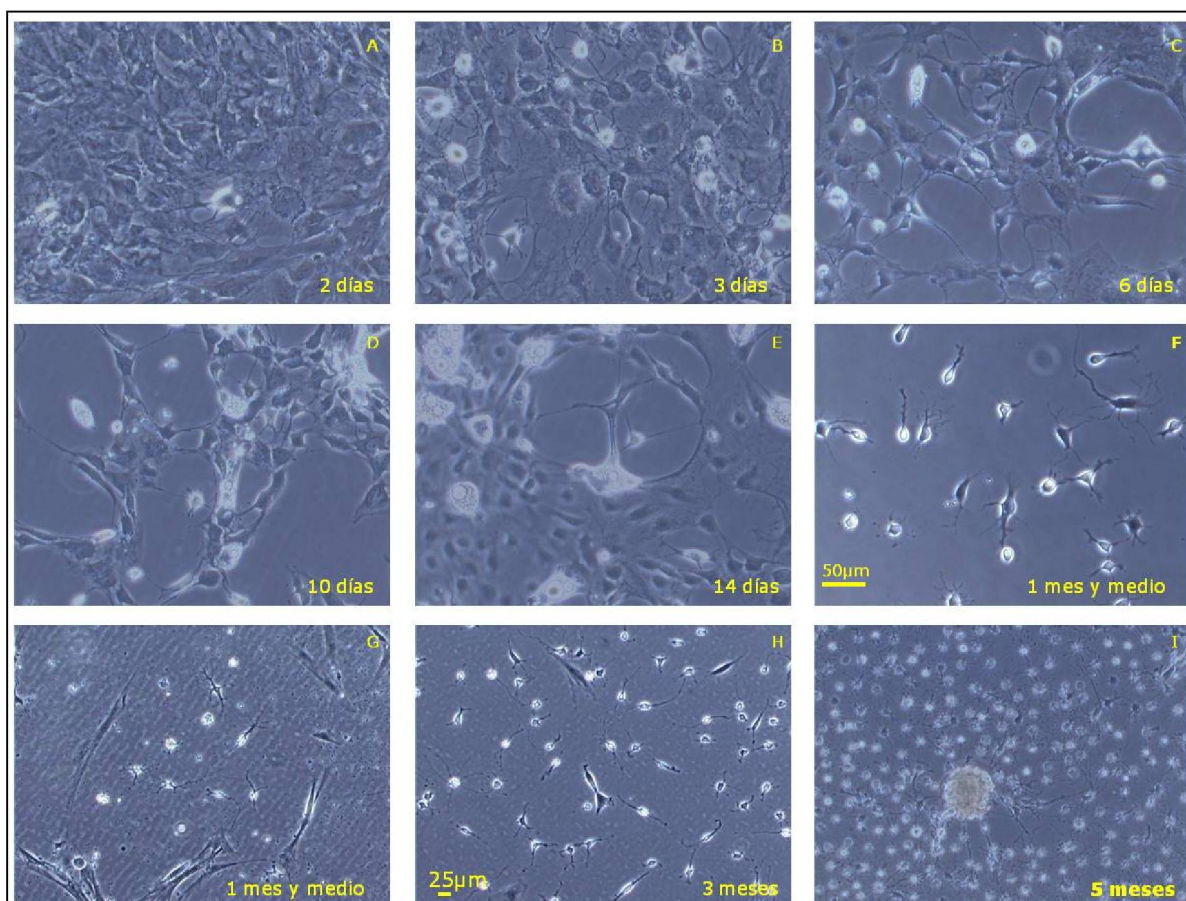


Figura 22. Evolución en el tiempo de rADSC-SOZ_a. Barra de escala (A-F): 50μm y (G-I): 25 μm

Se estudió el efecto del pretratamiento adipogénico en las rADSC transducidas con SOZ, SON, SONZ, OZ y O. Una vez terminado el pretratamiento adipogénico se cambió el medio de cultivo a las células por NBB27 con factores de crecimiento y doxiciplina. En el caso de las rADSC transducidas con SOZ, en concreto, se produjo desde el primer día un cambio morfológico, mostrando células redondeadas y con pequeñas ramificaciones, aunque tenían un tamaño mayor que el de los progenitores de oligodendrocito. Con el tiempo en cultivo, sin embargo, el

tamaño de las células redondeadas fue reduciéndose (Fig. 22) y se situaron separadamente del resto de las células. Debido a este cambio tan gradual, no se puede datar con precisión la aparición de la primera célula con morfología oligodendrocítica, que se resume en la Tabla 1 a modo orientativo, cuando las células fueron sometidas a pretratamiento adipogénico.

Si bien este pretratamiento no disminuyó notablemente el tiempo de aparición de la primera colonia de células con morfología oligodendrocítica o que se marcaban con O4 con respecto a los cultivos reprogramados con SOZ sin pretratamiento, se pudo observar que tanto la pureza como la durabilidad de los cultivos enriquecidos en células O4+ a largo plazo eran superiores cuando se sometían a inducción adipogénica previa a la activación de los transgenes. En cambio, cuando dicha inducción adipogénica se aplicó simultáneamente a la activación de los transgenes con doxíciclina, la eficiencia de reprogramación disminuyó notablemente con respecto a los anteriores.

b) Ácido retinoico

El ácido retinoico (RA) es un morfógeno neuralizador que se usa como paso imprescindible durante la diferenciación neural de las células pluripotentes. Realizamos tratamiento con ácido retinoico (all-trans) 1 μ M (que simbolizamos con una “**R**” tras la combinación de transgenes) durante 4-5 días a las rADSC transducidas con SOZ, SONZ, OZ y O (Fig. 23). Con ello pretendíamos fomentar la transición mesenquimo-epitelial de las rADSC antes de la activación de los transgenes reprogramadores. Tan sólo en algunos casos, que describiremos más adelante, se apreció un incremento de la eficiencia con este pretratamiento.

c) RepSox

El RepSox es una pequeña molécula que puede sustituir a los factores de transcripción Sox2 y c-Myc en la reprogramación hacia células pluripotentes inducidas, Ipsc (Ichida y cols., 2009; Solanki y Lee, 2010; Liu y cols., 2013; Cheng y cols., 2014). Por ello, consideramos que podría ser útil para la desprogramación de las células mesenquimales.

Se realizó el tratamiento con RepSox (que simbolizamos con una "X" tras la combinación de transgenes) a las células rADSC transfectadas con SOZ, OZ y O antes de la activación con doxiciclina. El pretratamiento con RepSox produjo células bipolares, pero no llegaron a desarrollarse como células con morfología oligodendroglial.

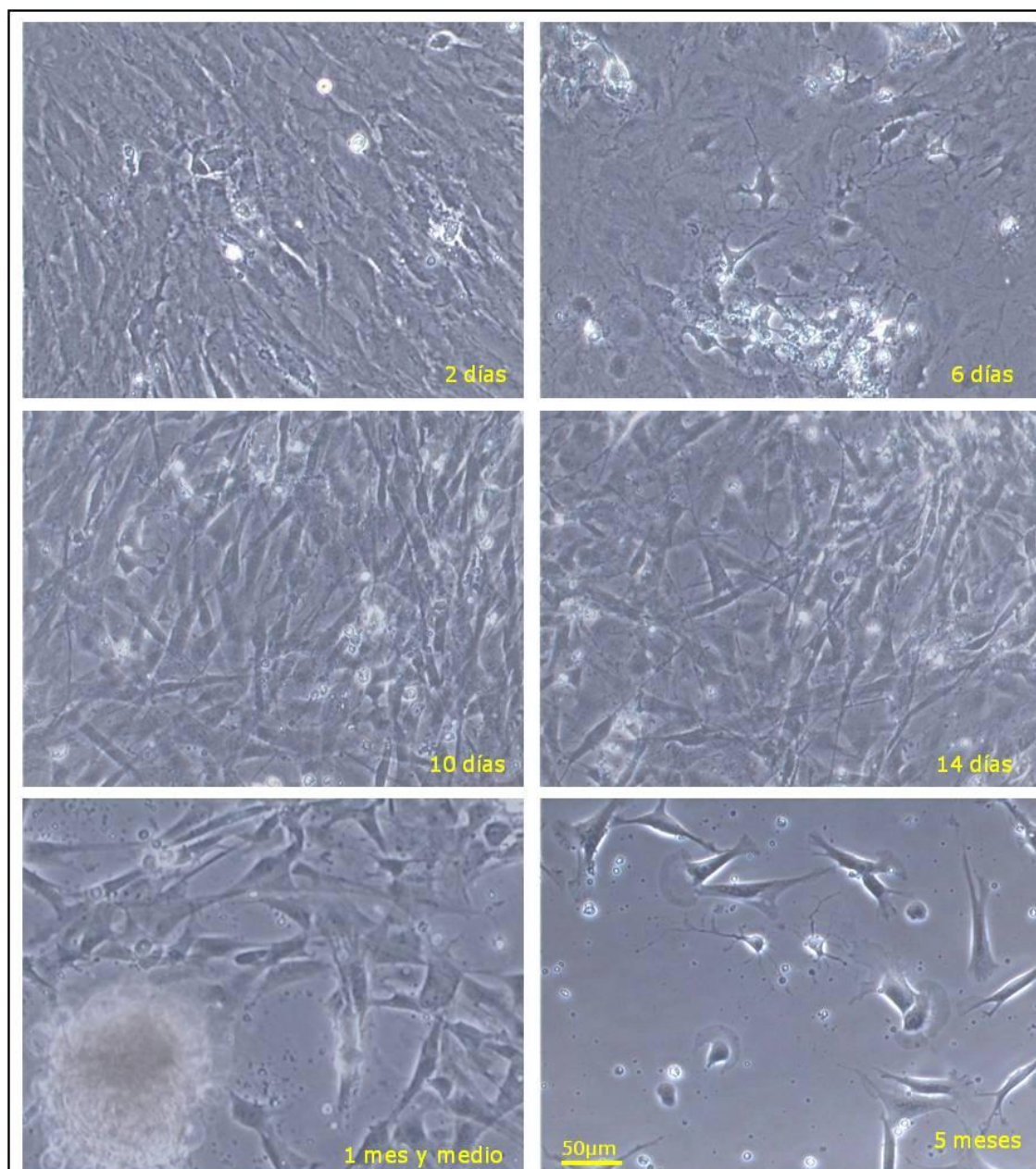


Figura 23. Evolución en el tiempo de SOZ_R. Barra de escala: 50 μm

d) Combinaciones de pretratamientos

También estudiamos combinaciones de estos pretratamientos (**a**, **R**, **X**) para conseguir mejorar la eficacia de la transdiferenciación de rADSC hacia progenitores

de oligodendrocitos. No se consiguió reducir el tiempo de aparición de éstos, pero sí mejoramos la eficacia con el pretratamiento RA+RepSox (**R+X**) de las células rADSC-SOZ, en comparación con las células tratadas sólo con RepSox, a juzgar por el número de colonias de células pequeñas redondeadas y ramificadas.

Tabla 1. Manifestación de las células transdiferenciadas según los distintos pretratamientos. El tiempo se cuenta a partir del día de la primera activación de los transgenes con doxiciclina.

Células reprogramadas	Primera célula con morfología oligodendroglial	Tiempo adicional para la aparición de la primera colonia
SOZ_a	2-3 semanas*	1-1 ½ semanas
SOZ_R	4 semanas	2 semanas
SOZ_X	4 semanas	2 semanas
SOZ_{R+X}	4 semanas	2 semanas
SOZ_{a+X}	4 semanas	2 semanas
SON_a	No se obtuvieron células con morfología oligodendroglial	
SONZ_a	3 semanas	1 semana
SONZ_R	5 semanas	1 semana
OZ_a	8 semanas	
OZ_R	5 semanas	2 semanas
OZ_X	8 semanas	
OZ_{R+X}	8 semanas	
O_a	6 semanas	
O_R	6 semanas	1 semana
O_X	8 semanas	
O_{R+X}	8 semanas	

*Cambio gradual de la morfología de las células.

** Las células reprogramadas con OZ y O en los distintos tratamientos no se mantuvieron más de 8 semanas y media y sólo se observaron células con morfología bipolar.

e) Selección con Zeocina

Los plásmidos lentivirales utilizados para la sobreexpresión de los transgenes de los factores de transcripción contienen, además, un gen de selección eucariótica *ble sh* que confiere resistencia a la zeocina. Realizamos unos experimentos iniciales con 100 µg/ml para eliminar del cultivo las células que no habían sido transducidas, con la intención de aumentar la pureza en progenitores de oligodendrocitos de los cultivos reprogramados.

Sin embargo, incluso con las dosis menores se producía una detención de la proliferación celular, una muerte retardada de las células en el cultivo, un aumento del tamaño de las células planas y una práctica ausencia de células de morfología oligodendrocítica. Además, como discutimos más adelante, la presencia de células de planas de tipo mesenquimal parece esencial para el mantenimiento de las células redondas y ramificadas que contactan con ellas en los pimeros momentos de la reprogramación, por lo que la selección celular podría no ser beneficiosa para la transdiferenciación de los oligodendrocitos a partir de células mesenquimales. Por ello, no se volvió a utilizar zeocina como agente de selección para el resto de los experimentos.

4. Características inmunocitoquímicas de las células reprogramadas con SOZ

El rasgo más definitorio de la adquisición del fenotipo oligodendrogial fue la inmunotinción por O4, que era negativa en las células rADSC y hADSC en condiciones basales o tras la inducción farmacológica descrita anteriormente.

El porcentaje de células O4 positivas llegó a ser en ocasiones superior al 70% de la población total de rADSC-SOZ con pretratamiento adipogénico, sin realizar selección por zeocina (Fig. 24).

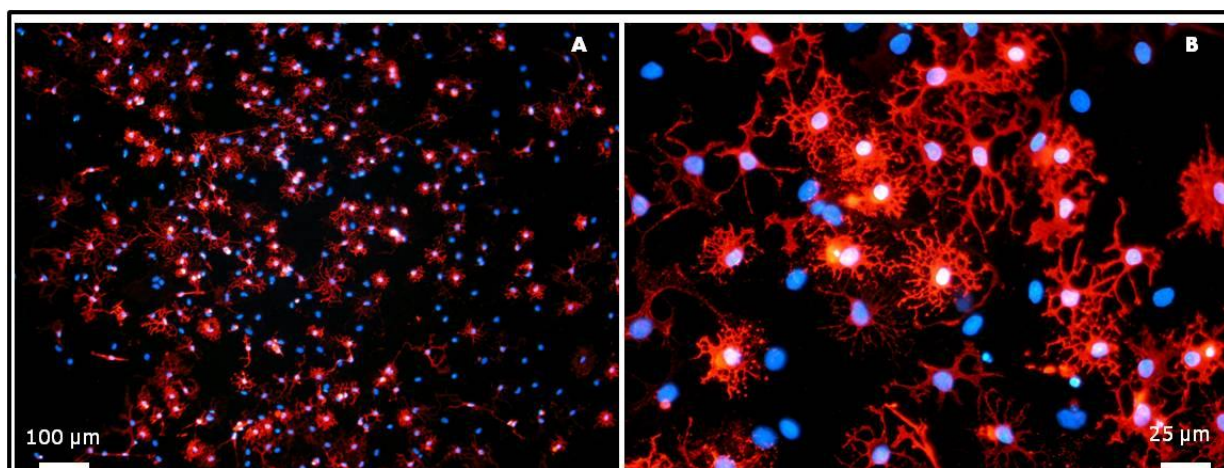


Figura 24. Marcaje con O4 en células rADSC-SOZ_a en cultivos de 3 meses. Contratación en azul con bis-benzimida para marcar todos los núcleos. Escala A: 100 µm y B: 25 µm.

Los cultivos de células rADSC-SOZ_a con morfología de células pequeñas refringentes y ramificadas podían presentar inmunotinción membranal para O1. Muchas células del cultivo se teñían para GFAP (en ocasiones, simultáneamente al O4 o el O1), para p75NTR (receptor NGF de baja afinidad, también llamado CD271 o LNGFR, y detectado con el anticuerpo monoclonal 192 (Chandler y *cols.*, 1984)), para MBP y para MAG (clon 513(Poltorak y *cols.*, 1987)) (Fig. 25). Además observamos que las células que se marcaban con O4 y las células que expresaban GFAP coexistían por separado en el mismo cultivo pero aparentemente interaccionaban entre ellas mediante contactos celulares. En ocasiones había células que coexpresaban GFAP y p75NTR. Las células que se marcaban con O4 no co-expresaban GFAP (Fig. 25).

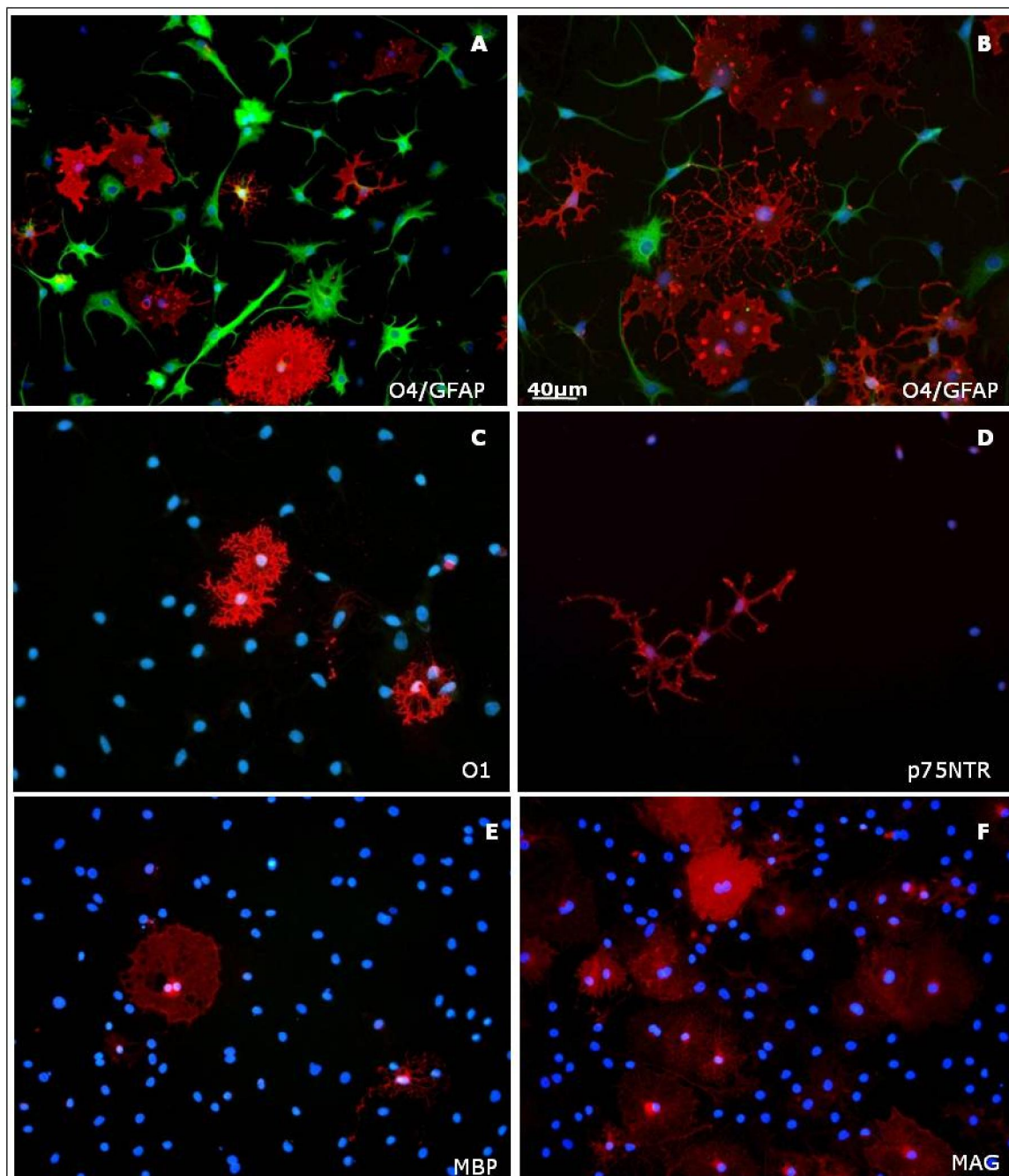
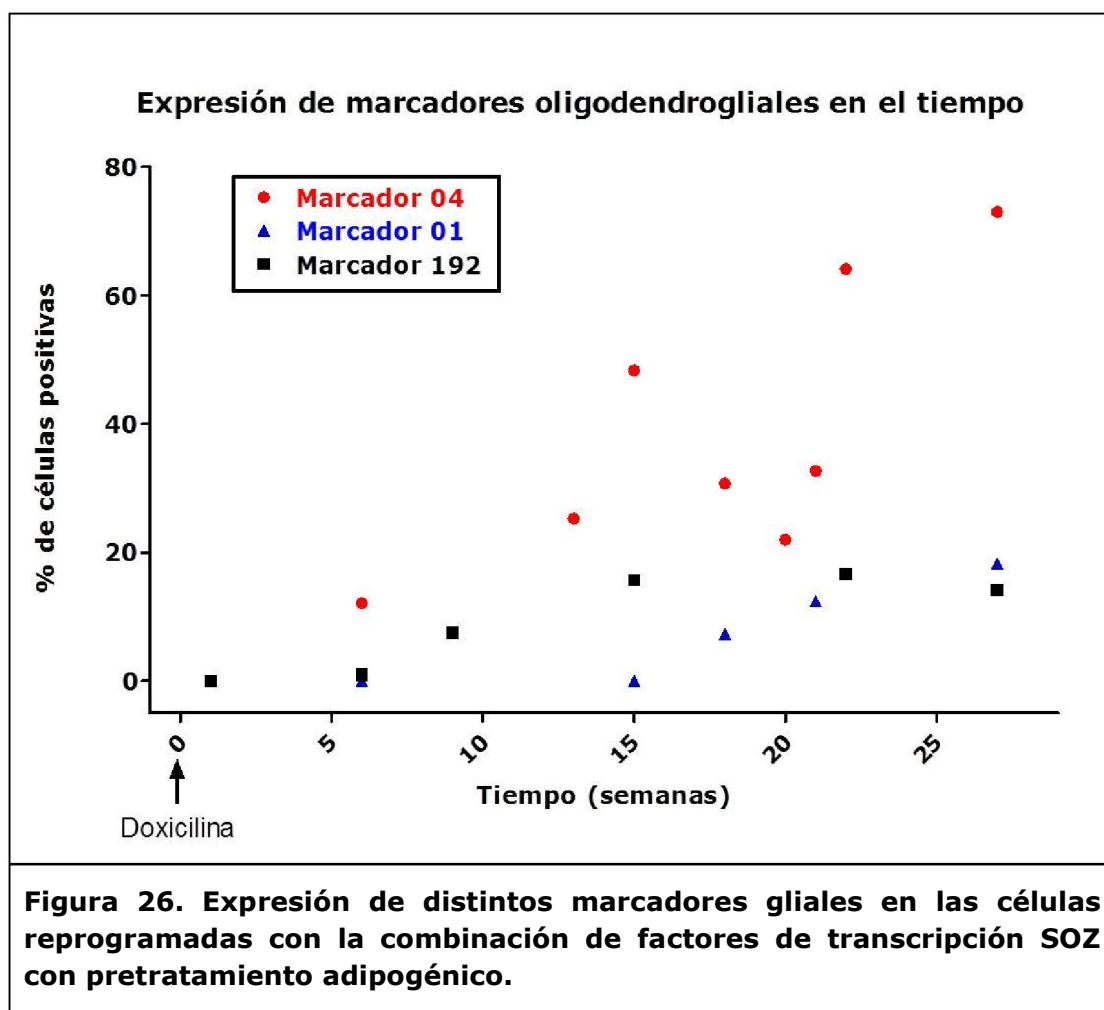


Figura 25. Expresión de marcadores gliales en rADSC-SO2a. A y B muestran dos áreas diferentes del cultivo en las mismas condiciones teñidas para O4/GFAP. Cultivos hermanos teñidos con O1, anti-MBP, anti-p75NTR y anti-MAG en rojo. Contratinción en azul con bis-benzimida para marcar todos los núcleos celulares. Barra de escala: 40 μm



La proporción de células que expresaban cada uno de estos marcadores varió a lo largo del tiempo tras la activación de los transgenes con doxiciclina, de tal manera que el porcentaje de células O4+ en el cultivo continuó incrementándose hasta superar el 70% a las 27 semanas (Fig. 26). Posiblemente este continuo incremento se deba a que esta población de PCO estaba favorecida por las condiciones del medio de cultivo, que incluía factores que promueven la proliferación de este tipo celular, como EGF, FGFb y PDGF-AA. En cambio, la población de oligodendrocitos más maduros (O1+) se mantuvo por debajo del 20%, tras alcanzar su máximo a las 15 semanas. La población de células p75NTR+ (Clon 192), que podían representar un fenotipo de progenitor de cresta neural, células de Schwann o incluso células de glía envolvente (aunque no las hemos analizado detenidamente en el presente trabajo) incrementó a partir de la semana 15 (Fig. 26). Aunque no se representan en esta gráfica, más adelante los cultivos llegaron repentinamente a una fase en la que desaparecieron casi todas las células refringentes, por lo que la expansión de los PCO transdiferenciados de rADSC parecía tener un límite a partir de los 7 meses de cultivo continuo.

5. Efecto de los diferentes pretratamientos sobre las características inmunocitoquímicas de las rADSC reprogramadas

Como mencionamos más arriba, la combinación de factores de transcripción que resultó más eficaz para la generación de PCOs en rADSC fue SOZ (Sox10, Olig2 y Zfp536). En la tabla 2 se muestra el efecto de varios pretratamientos sobre porcentaje de células que expresaron marcadores gliales al cabo de 1 mes y medio de sobreexpresión de SOZ en los cultivos de rADSC. Se puede apreciar que el pretratamiento con cóctel adipogénico favorecía la transdiferenciación temprana hacia PCO en comparación con otros pretratamientos.

Tabla 2. Efecto de los distintos pretratamientos en la combinación SOZ a un mes y medio de activación de los transgenes con doxiciclina

Distintos pretratamientos en la combinación SOZ	% O4	% O1	% p75NTR
Adipogénico	12,73%	0%	10,75%
RA	2,09%	0%	4,06%
RA + RepSox	4,85%	2,01%	6,66%

El pretratamiento adipogénico no mejoró la eficiencia de la combinación de SON de factores de transcripción (Sox10, Olig2 y Nkx6.1) para generar PCO, a pesar de que inicialmente los cultivos presentaban células de morfologías tipo-oligodendroglial, pero éstas fueron desapareciendo con el tiempo, quedándose el cultivo con células de tipo mesenquimal exclusivamente.

Tampoco el pretratamiento adipogénico permitió mejorar la transdiferenciación con la combinación SONZ (Sox10, Olig2, Nkx6.1 y Zfp536) pues, en estas condiciones, el cultivo formaba agregados celulares con poca adhesividad al plástico (lo cual imposibilitaba el manejo y mantenimiento del cultivo). En lo que estas condiciones permitieron analizar, se observó que las células presentaban una morfología de células refringentes de pequeño tamaño con múltiples ramas finas. En cambio, cuando las rADSC-SONZ fueron pretratadas con ácido retinoico, sí pudieron obtenerse células en gran cantidad (hasta 40% de las

células) con fenotipo O4+, lo cual no había sido posible hasta entonces sin este pretratamiento.

Las células rADSC-SOZ_R llegaron a marcarse con O1 a partir del segundo mes de cultivo, pero nunca llegaron a desarrollarse morfológicamente como las células rADSC-SOZ y rADSC-SOZ_a. Estas células O4+ generadas con SONZ, así como las marcadas con O1, presentaban una morfología que podríamos considerar aberrante, muy diferente de la que se observa en cultivos primarios de cerebro de rata o de la morfología que se observaba en los cultivos reprogramados con SOZ (Fig 27). Resulta también destacable en los cultivos reprogramados con SONZ el número de células p75NTR+ que, estas sí, presentaban una morfología equiparable a la de los progenitores de cresta neural o la de las células Schwann/glía envolvente. Estos cultivos, sin embargo, perdieron rápidamente las células ramificadas siendo poblada la superficie por células aplanadas de tipo mesenquimal.

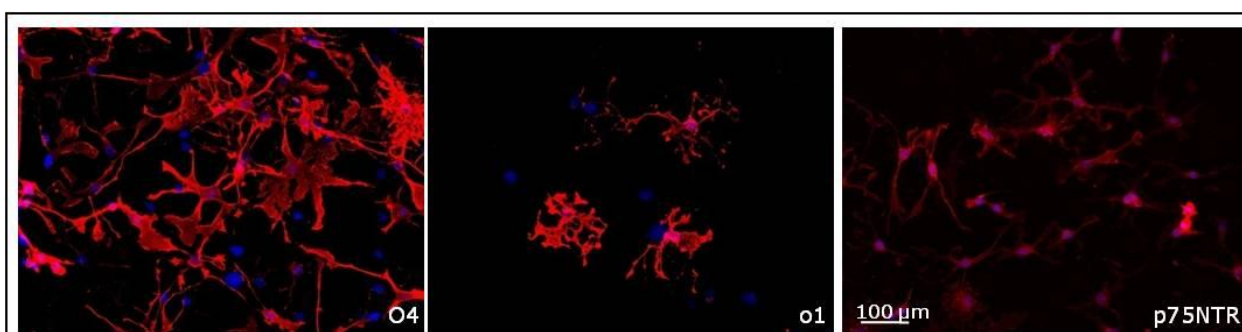


Figura 27. Expresión de marcadores gliales en rADSC_R-SONZ. Contratinción en azul con bis-benzimida para marca todos los núcleos celulares. Barra de escala 100 μm.

6. Selección inmunomagnética de las células O4 positivas en rADSC

En un intento de obtener poblaciones puras de PCO, se sometieron a selección inmunomagnética en base a su marcaje con O4 los cultivos reprogramados con rADSC-SOZa durante 13 semanas. Tras despegar las células con Accutase, fueron reaccionadas en suspensión con el monoclonal O4 (sobrenadante estéril) y posteriormente éste fue marcado con anti-IgM de ratón conjugado con nanopartículas magnéticas (y también con un anti-IgG conjugado con marcador fluorescente, para comprobar la pureza y eficacia de la selección). Esta suspensión celular fue pasada por columnas de microbolas paramagnéticas MS y separada mediante un sistema de imán (MiniMacs).

De la selección obtuvimos dos fracciones: a) la fracción negativa, es decir, la suspensión de células que no habían quedado retenidas en la columna, en la cual no se encontró ninguna célula que estuviera marcada fluorescentemente tras la selección, lo que demostraba que la inmunoselección negativa fue altamente eficaz, b) la fracción positiva, constituida por las células retenidas en la columna bajo campo magnético y que se eluyeron tras retirar la columna del imán. En esta población positiva encontramos que sólo el 50% de las células tenía marcaje fluorescente. Una purificación mayor podía obtenerse pasando dicha fracción positiva por una segunda columna de separación magnética.

Cuando la fracción positiva fue sembrada en nuevas placas, no se consiguió un cultivo purificado de PCOs (el número de células O4+ fue de 41 % al cabo de una semana). Además había oligodendrocitos maduros (17,95 % de células O1+) y un 24,5 % de las células expresaban GFAP.

Cuando se cultivó la fracción negativa, se observó la aparición de *novos* de células O4+ (14,36 % al cabo de 7 días), con un porcentaje insignificante (0,85 %) de células O1+. Esto nos indicaba que en la fracción negativa existe una población significativa de células que aún son O4- pero que pueden convertirse rápidamente en PCOs y, por otra parte, que en los cultivos con largos períodos de reprogramación (más de 3 meses) no todas las células O4+ provienen de mitosis de los PCOs preexistentes. Los resultados también demuestran que en ausencia de células O4+ no se generan células O1+. Por otra parte, estos cultivos derivados de la inmunoselección negativa presentaban una elevada proporción de células GFAP+ (55,35 %), ninguna de las cuales comarcaba con O4.

Dado que la inmunoselección no nos permitió manejar poblaciones puras de PCOs, que una vez seleccionadas las células no se producía incremento de la población de O4+, que en esa fracción inmunonegativa hay células con posible efecto trófico o diferenciador sobre las células positivas y que podríamos estar descartando células que van a seguir produciendo PCO (en los meses siguientes la población de células O4+ siguió aumentando hasta más del 70 % del total), se descartó realizar selección inmunomagnética para enriquecer la población de PCOs.

7. Análisis de las células reprogramadas por RT-PCR

La expresión del ARN mensajero de diferentes moléculas implicadas en el desarrollo oligodendroglial se analizó cualitativamente mediante RT-PCR en las rADSC-SOZ.

Estos análisis demostraron la expresión del mRNA de Sox-2, CNPasa, MBP, Sox10, MOG y Olig-2 en las células rADSC-SOZ sin pretratamiento y con los pretratamientos adipogénico y con ácido retinoico.

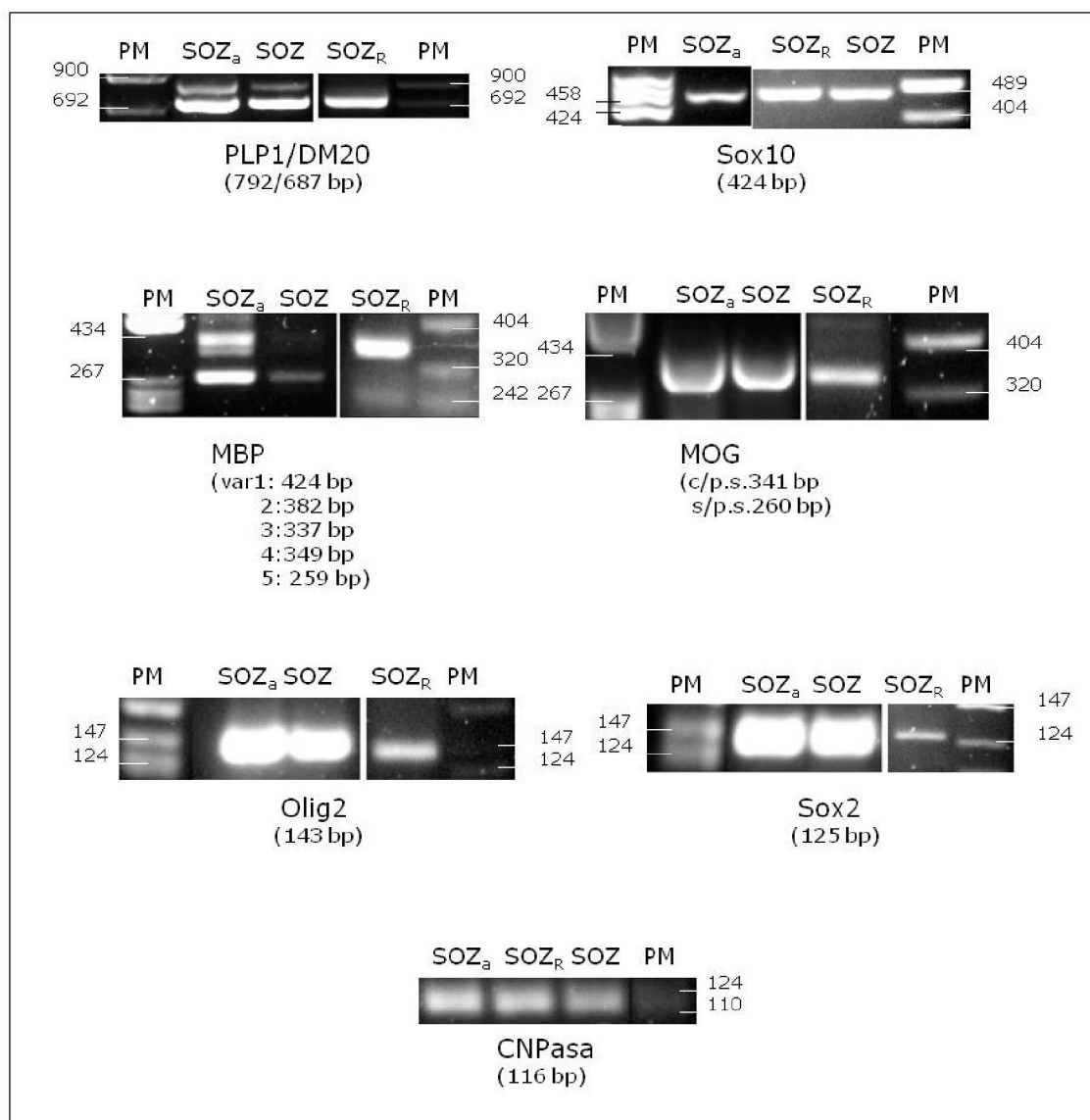


Figura 28. PCR-RT de diversos mRNA característicos de oligodendrocitos en rADSC de rata transducidas con la combinación de los factores de transcripción SOZ con diferentes pretratamientos.

Imagen negativa de la tinción de ácidos nucleicos con Gelstar. Con una marca se indica la altura esperada de la banda de cDNA. PM: marcador de peso molecular. Bajo el nombre de cada molécula se escribe el tamaño esperado del amplicón en pares de bases (bp). Se puede apreciar expresión de PLP1/DM20 en las rADSC-SOZ con pretratamiento adipogénico o sin pretratamiento, mientras que las células pretratadas con RA no expresan la isoforma miélinica. Se observan asimismo expresión de varias isoformas de MBP en las células con pretratamiento adipogénico. En todos los casos hubo expresión de MOG en su variante con péptido señal, de olig2, de Sox2 y de CNPasa. La expresión de Sox10 era esperable, ya que las células habían sido transducidas con este factor de transcripción.

Las células reprogramadas rADSC-SOZ_a y las rADSC-SOZ expresaban PLP1 y DM20 (Fig. 28), a diferencia de lo observado en las rADSC en condiciones basales (Fig.15) y en las rADSC-SOZ_R, que expresaban DM20, pero no PLP1 (Fig.28).

Nuestros análisis por RT-PCR mostraron que el RNA de MOG (Fig. 28) se transcribe en su isoforma que contiene péptido señal, que es la porción de la proteína que lo dirige hacia la membrana.

Hay que añadir que, como se aprecia en la tabla de material y métodos, la RT-PCR para MBP, CNPase, Olig2 y Sox10 se ensayó con dos combinaciones diferentes de primers, de las cuales sólo una se muestra en la Fig.28. Esto supone una confirmación de la expresión de estos marcadores oligodendrogiales en las células rADSC-SOZ.

8. Estudio de la mielinización en cultivo: cosiembrar de células reprogramadas sobre neuronas ganglionares de las raíces dorsales

Las neuronas de los DRG producen largos axones de grueso calibre que pueden ser mielinizados en cultivo tanto por células de Schwann como por oligodendrocitos. Para demostrar que los PCOs obtenidos mediante reprogramación celular directa por factores de transcripción eran oligodendroglía auténtica, se realizaron cosiembras de las rADSC-SOZ que presentaban un porcentaje alto de células O4+ sobre cultivos de DRGn depurados de células de Schwann. Con ello, pretendíamos evidenciar si las células rADSC-SOZ_a y rADSC-SOZ eran capaces de mielinizar axones y, por lo tanto, demostrar así que eran células que, además de expresar marcadores de oligodendrocitos maduros, eran funcionales. Además, parte de los cocultivos fueron tratados con benztropina pues una publicación reciente propone que este fármaco anticolinérgico potencia la maduración de los oligodendrocitos, favoreciendo la mielinización (Deshmukh y cols., 2013).

La inmunofluorescencia para el MBP mostró tinción en oligodendrocitos transdiferenciados (Fig. 30) (así como en las células de Schwann que no se habían podido eliminar). También se probó la inmunotinción para OSP (*Oligodendrocyte Specific Protein*)/Claudin-11 pero se marcaban los axones, los oligodendrocitos no mielinizantes, las células mesenquimales (no transdiferenciadas) y los oligodendrocitos mielinizantes; en nuestras manos, la tinción con el anticuerpo

contra OSP/claudin-11 más utilizado en la literatura no producía una tinción específica de mielina y nodos de Ranvier de oligodendrocitos. La inmunotinción tanto para MOG como para CNPasa con los anticuerpos que probamos resultó ser demasiado inespecífica, marcando todo tipo de células, incluyendo mesenquimales, y produciendo un fondo elevado en los axones, por lo que no se utilizó para demostrar el progreso de la mielinización.

La inmunotinción con O1 (Fig.29) proporcionó imágenes indicativas de mielinización a cargo de oligodendrocitos. Los oligodendrocitos maduros y mielinizantes expresan el galactocerebrósido detectado con el anticuerpo O1 y, aunque también se puede expresar en las células de Schwann contaminantes, éstas sólo se marcan con O1 cuando dejan de mielinizar su axón, por lo que O1 resultó ser un marcador de mielina de oligodendrocito más específico que MBP en este tipo de material. La inmunotinción con O1 proporcionó un marcaje de las células reprogramadas a lo largo de varios trayectos de axones de las DRGn, demostrados por tinción de β -tubulina isotipo III (β -tub III). Al microscopio confocal, a gran resolución, se apreciaba que el marcaje con O1 rodeaba al marcaje de la β -tub III, lo que sugiere que los oligodendrocitos están envolviendo el axón (Fig.34).

La adición de benztropina al cocultivo (Figs. 31, 32 y 33) produjo un mayor número de perfiles tipo-mielina que cuando no llevaba este fármaco. Esto, por una parte, apoya el hecho de que nuestras células transdiferenciadas se comportan igual que los oligodendrocitos, pues responden de manera similar a como se ha reportado en experimentos *in vivo*, y por otra parte nos proporciona una herramienta más, la benztropina, para la maduración *in vitro* de los oligodendrocitos reprogramados.

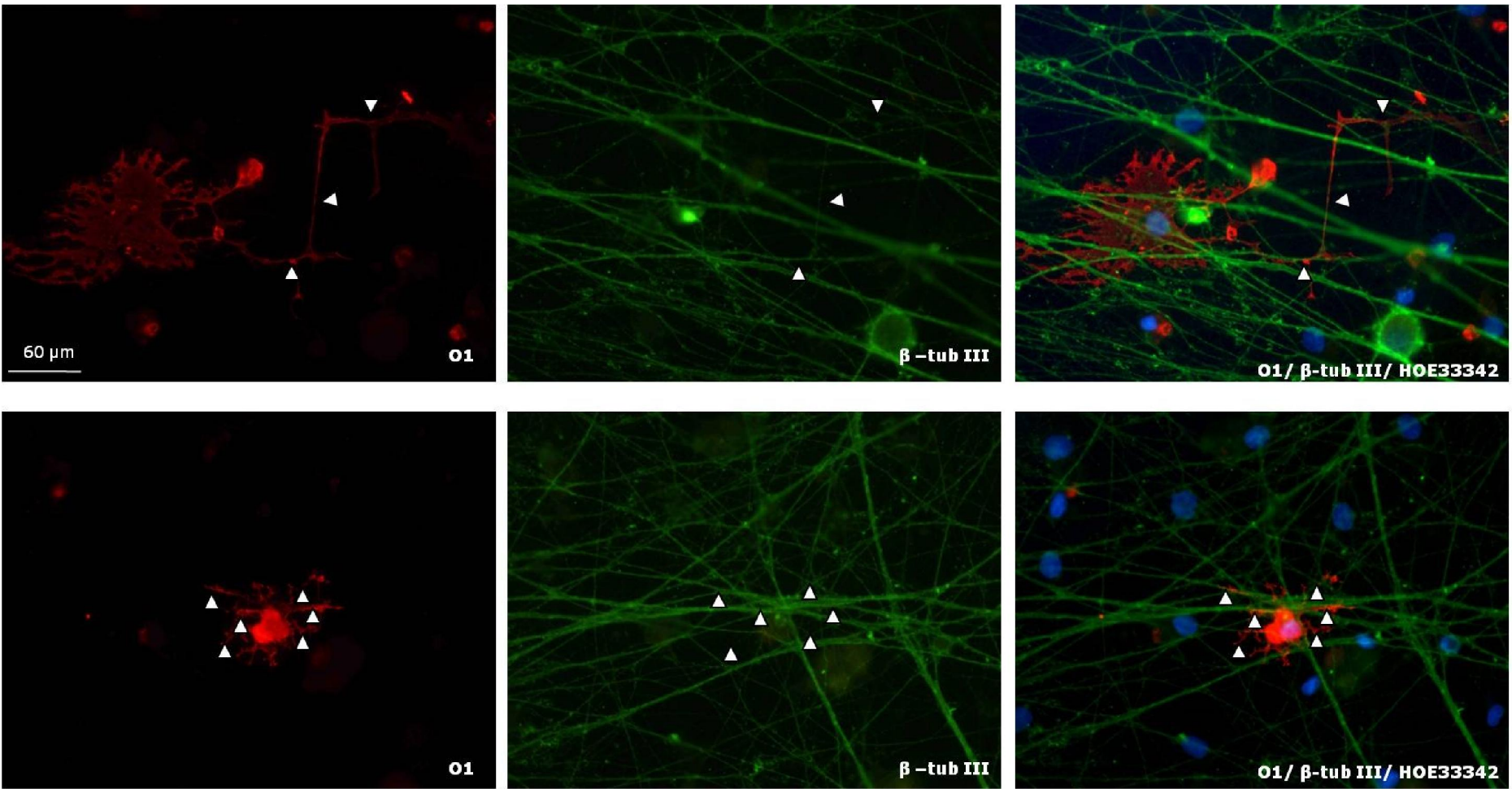


Figura 29. Co-cultivo de rADSC-SOZ_a con neuronas de los ganglios de las raíces dorsales inmunoteñido con O1 frente β -Tubulina III. Se observan axones recubiertos por oligodendrocitos marcados con O1 (algunos de ellos, indicados con punta de flecha). Barra de escala: 60 μ m

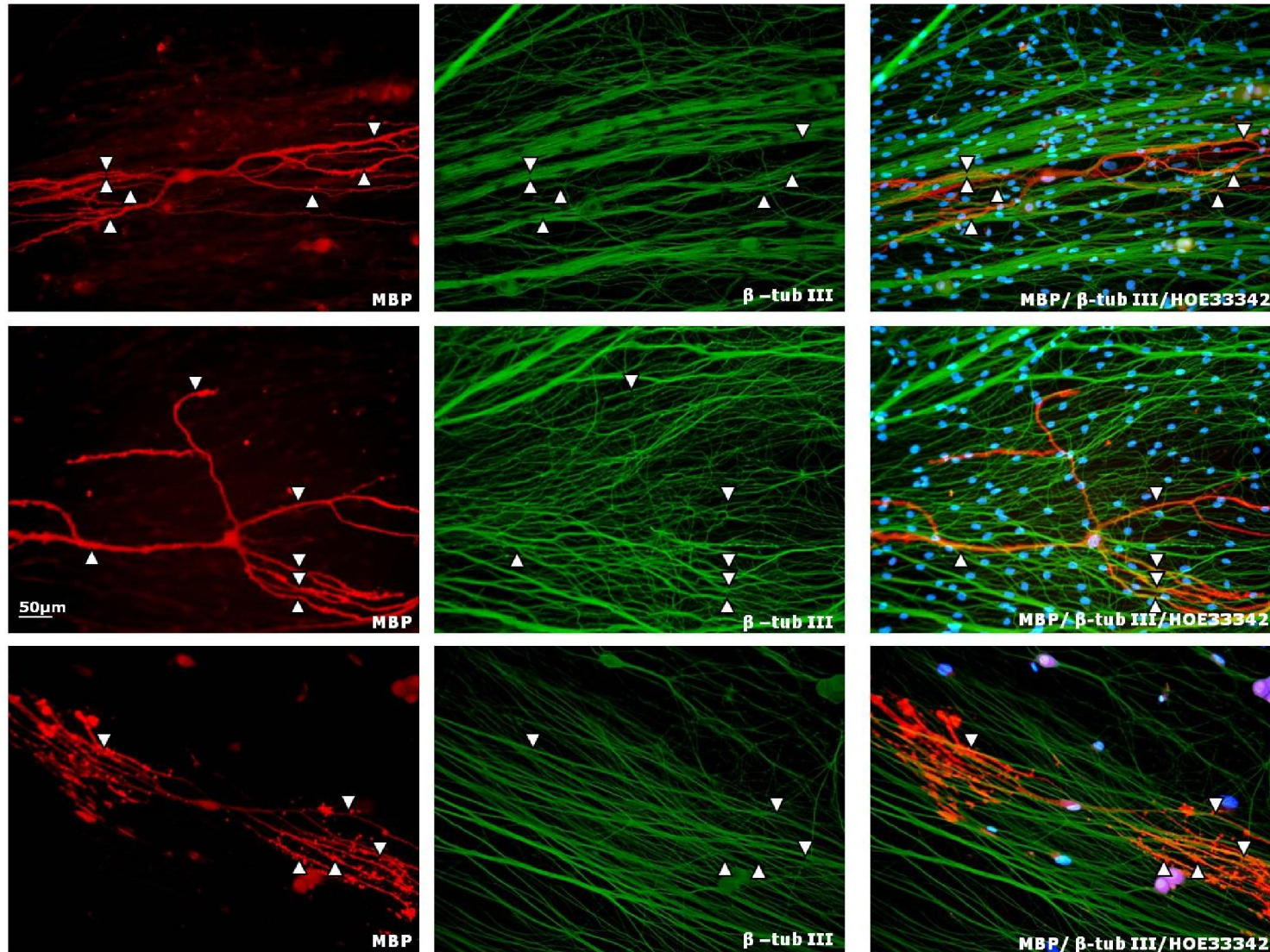


Figura 30. Co-cultivo de rADSC-SOZ_a con neuronas de los ganglios de las raíces dorsales inmunoteñido con MBP frente β-Tubulina III. Se observan axones recubiertos por oligodendrocitos marcados con MBP (algunos de ellos, indicados con punta de flecha). Barra de escala: 50 μm

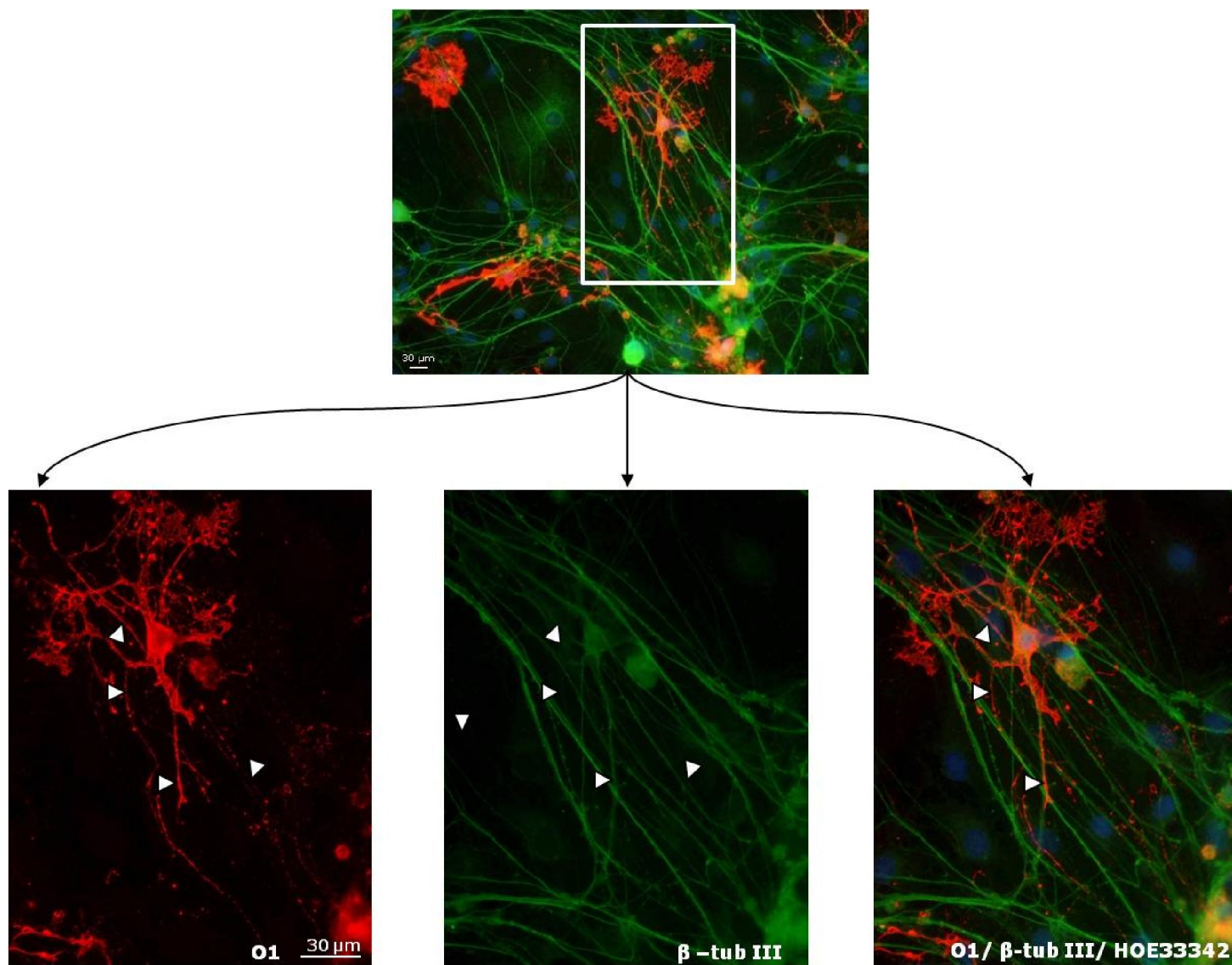


Figura 31. Co-cultivo de rADSC-SOZ con neuronas de los ganglios de las raíces dorsales tratado con benztropina, durante una semana. Inmunoteñido con O1 frente β -Tubulina III Se observan axones recubiertos por oligodendrocitos marcados con O1 (algunos de ellos, indicados con punta de flecha). Barra de escala: 30 μ m

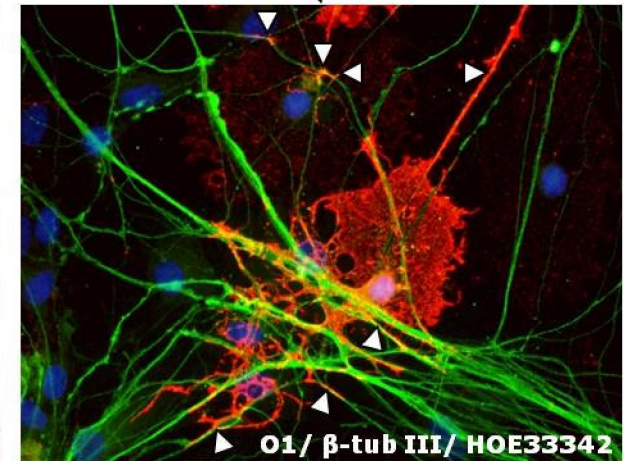
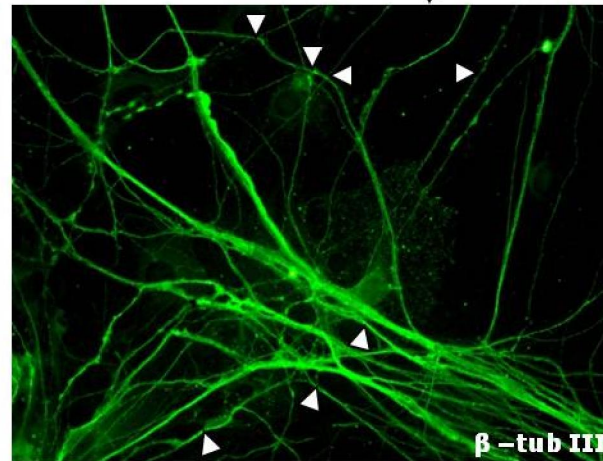
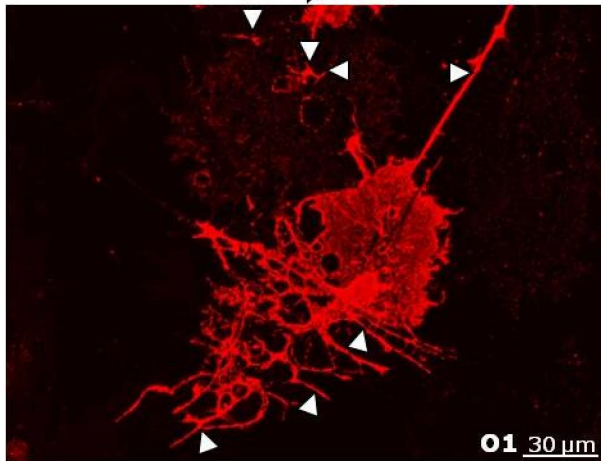
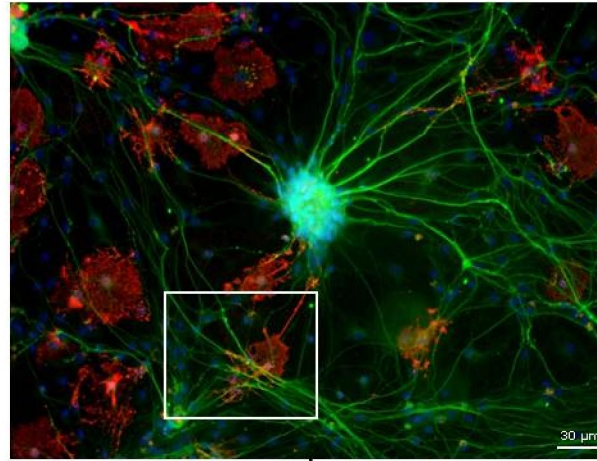


Figura 32. Co-cultivo de rADSC-SOZ con neuronas de los ganglios de las raíces dorsales tratado con benztropina, durante una semana. Inmunoteñido con O1 frente β-Tubulina III. Se observan axones recubiertos por oligodendrocitos marcados con O1 (algunos de ellos, indicados con punta de flecha). Barra de escala: 30 μm



Figura 33. Co-cultivo de rADSC-SOZ con neuronas de los ganglios de las raíces dorsales tratado con benztropina, durante una semana. Inmunoteñido con O1 frente β -Tubulina III. Se observan axones recubiertos por oligodendrocitos marcados con O1 (algunos de ellos, indicados con punta de flecha). Barra de escala: 30 μ m

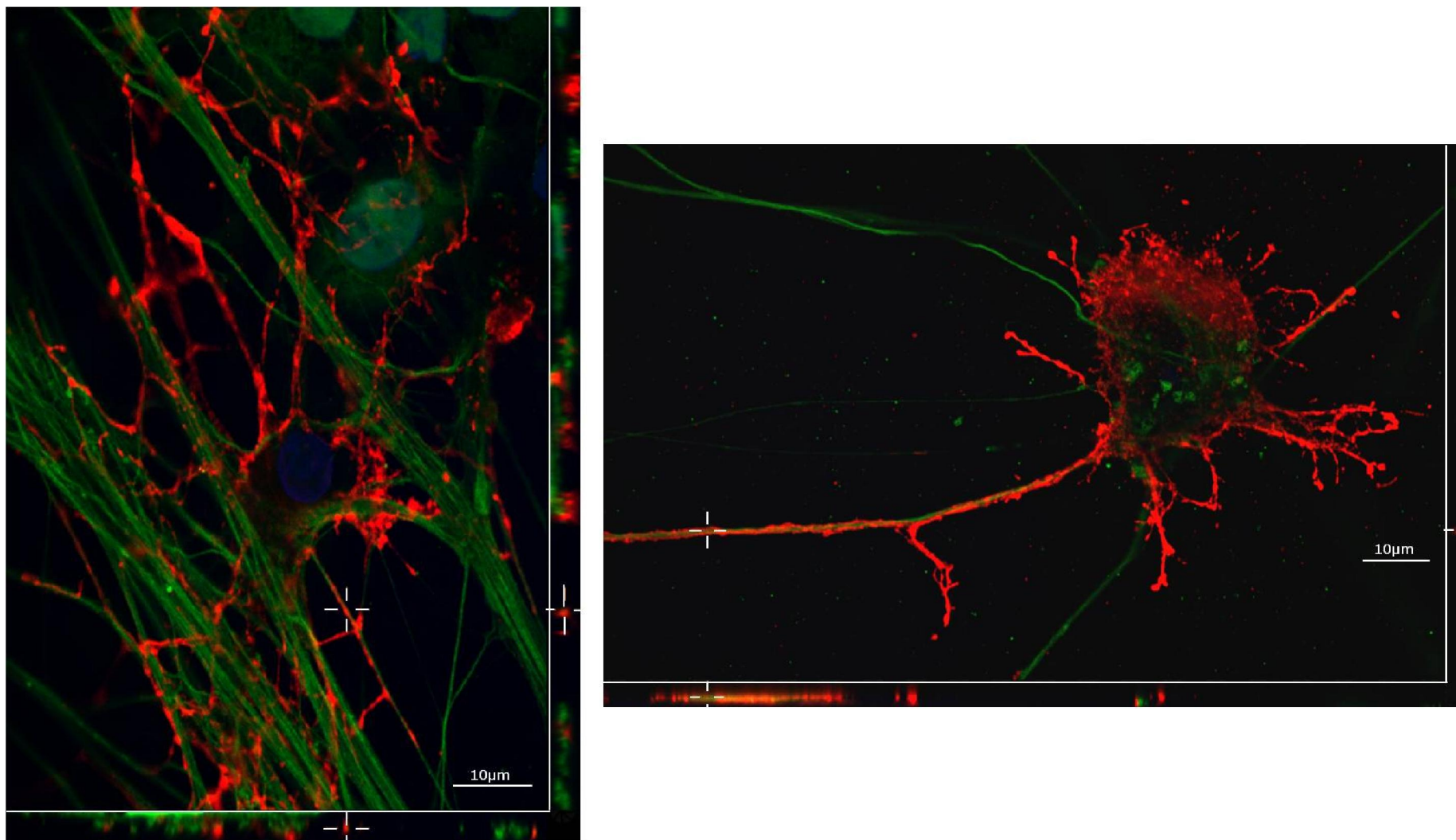


Figura 34. Co-cultivo de rADSC-SOZ con DRGn tratado con bupropion, durante tres semanas. Inmunoteñido con O1 frente β -Tubulina II. Imagen confocal con eje Z (de profundidad) donde se aprecia en las zonas marcadas con una cruz que el marcaje del oligodendrocito rodea el axón. Imágenes de dos cultivos distintos. Barra de escala: 10 μ m

Discusión

1. Transdiferenciación neural farmacológica

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que los cultivos de células mesenquimales (ASDC), en condiciones basales, son capaces de expresar una gran variedad de moléculas consideradas comúnmente como marcadores neuronales (β -tubulina III, MAP2a+b, MAP5, Tau, enolasa específica de neuronas, NeuN, cromogranina A, sinaptofisina, PGP9.5, GAP-43, varios neuropéptidos, periferina, α -internexina,..) marcadores gliales (GFAP, S-100, galactocerebrósido, RIP, P0, NG2..) o progenitores neurales (nestin, NeuroD, N-myc, doblecortina, SLUG..) simultáneamente a marcadores de células mesenquimales (vimentina, actina de músculo liso). Esta co-expresión de marcadores sugiere la existencia de características comunes entre las células mesenquimales y las células de SNC, a pesar de que su procedencia embrionaria sea muy diferente. *In vivo*, existe un tipo celular en el que se ha observado expresión de marcadores neurales fuera del sistema nervioso: las células de Leydig del testículo. En ellas se ha descrito marcaje con O1, A2B5, anti- CNPasa, nestina, neurofilamentos, enolasa específica de neuronas y GFAP (Davidoff y cols., 1999; Davidoff y cols., 2004; Ortega y cols., 2004). Curiosamente, las células de Leydig parecen regenerarse a partir de pericitos y células musculares lisas vasculares (Davidoff y cols., 2004), que son en gran medida los mismos componentes de la fracción vasculo-estromal del tejido adiposo que originan las ASDC en cultivo.

Sin embargo, los marcadores neurales descritos no siempre se localizan en las mismas estructuras subcelulares ni con la misma intensidad que en las células neurales, aparte de las evidentes diferencias morfológicas entre ambos tipos celulares.

Ello nos llevó a hipotetizar que las ASDC, en condiciones basales de cultivo, carentes de un entorno molecular definido, tienen un fenotipo inespecífico sobre el cual la aplicación de sustancias con acción conocida sobre la diferenciación neural, podría dirigirlo hacia la expresión funcional de características presentes en las células nerviosas.

Un tipo celular que resultaría particularmente interesante generar mediante inducción fenotípica en ASDC es la oligodendroglía. La degeneración de estas células por causas genéticas o esporádicas ocasiona graves enfermedades, como ocurre en las leucodistrofias o en la esclerosis múltiple. La disponibilidad de progenitores de oligodendrocitos producidos a partir de una fuente abundante e inocua, como es el tejido adiposo, podría permitir el diseño de estrategias de trasplante celular para reponer la mielina dañada (Sypecka, 2011; Watson y Yeung,

2011). Estas células mesenquimales poseen, además, una serie de características que ayudarían en dicha estrategia reparadora, tales como su plasticidad o sus propiedades neuromoduladoras y se ha comenzado a utilizar en ensayos clínicos, (Mizuno, 2010; Zavan y cols., 2010), en particular para la esclerosis múltiple (Uccelli y cols.).

Múltiples estudios han descrito “tratamientos inductores” o “medios de diferenciación” para obtener células neurales a partir de células mesenquimales en cultivo (Sanchez-Ramos y cols., 2000; Woodbury y cols., 2000; Safford y cols., 2002; Zuk y cols., 2002; Ashjian y cols., 2003; Cai y cols., 2004; Kang y cols., 2004; Franco Lambert y cols., 2009). Principalmente intentan obtener neuronas, por lo que la producción de oligodendrocitos a partir de ADSC no ha sido aún explorada salvo en contadas excepciones. Un estudio publicado asegura haber obtenido precursores oligodendrocíticos a partir de las ADSC aunque no se detallan los métodos utilizados ni se muestran claramente los resultados obtenidos (Kang y cols., 2006).

El procedimiento utilizado en nuestro laboratorio ha consistido en un tratamiento en dos fases: la primera fase consiste en “neuralizar” las células mesenquimales mediante pretratamiento con ácido retinoico (Okada y cols., 2004), que es el utilizado en todos los protocolos en los que se quiere obtener células neurales a partir de células pluripotentes. En una segunda fase, se aplican factores tróficos y/o dibutilil cAMP para probar si alguna de tales combinaciones produce un cambio (aumento del nº de células marcadas, cambio en la distribución subcelular del marcador, iniciación de la expresión de factores de transcripción propios de la génesis de oligodendrocitos...) que nos pudiera sugerir que se ha inducido el fenotipo oligodendroglial. Posteriormente, se realizan co-cultivos de estas células de tipo oligodendrocítico con neuronas de rata que no contengan previamente oligodendrocitos mielinizantes para comprobar si las células inducidas son funcionalmente mielinizantes.

1.1. Efecto de los tratamientos inductores sobre el marcaje con O1

En nuestro estudio hemos considerado el marcaje con el anticuerpo O1 como un indicador que nos podría señalar el efecto transdiferenciador de los diferentes tratamientos sobre las ADSC. El anticuerpo O1 (Sommer y Schachner, 1981) es una IgM que detecta galactolípidos, principalmente el galactocerebrosido, que se encuentra, asociado con el colesterol, en la membrana de los oligodendrocitos y en

su mielina (también se expresa en células de Schwann del SN periférico en determinadas condiciones) (Pieringer y cols., 1973; Burgisser y cols., 1988). Estos galactolípidos tienen una función estructural en la membrana del oligodendrocito, a la que confieren unas propiedades de fluidez peculiares, funciones relacionadas con la entrada de calcio y con la activación de la PKC, que produce alteraciones en el citoesqueleto (Dyer y Benjamins, 1990, 1991).

En los cultivos de ADSC de rata en condiciones basales (medio con 20% de suero) se observa tinción con O1 en la membrana de unas pocas células. El pretratamiento neuralizante con RA, cuando se realizó en medio definido, influyó en la cantidad y morfología de las células O1+ obtenidas tras el tratamiento con las diferentes combinaciones de citoquinas y/o dibutilil cAMP. Este último aparecía como el factor más determinante en la adquisición del fenotipo mO1+ con cuerpos celulares ramificados y la adición de citoquinas como EGF y FGFb incrementó la cantidad de estas células parecidas a oligodendrocitos.

Estos resultados observados mediante el análisis del marcaje con O1 parecían indicar que las rADSC habían adquirido características bioquímicas y morfológicas que las aproximaban al fenotipo oligodendroglial, pero aún tenían algunas diferencias con este tipo celular, como su mayor tamaño y el hecho de que no presentaran marcaje con O4 en ningún momento. A continuación, analizamos el efecto del tratamiento inductor sobre otros marcadores oligodendrocíticos.

1.2. Efecto de los tratamientos inductores sobre la expresión de moléculas propias de oligodendrocitos.

Los tratamientos inductores tuvieron un efecto menos evidente en la expresión de otras moléculas típicas del oligodendrocitos. En las rADSC en condiciones basales, la CNPasa alcanzaba concentraciones similares a las presentes en los progenitores de oligodendrocitos (analizadas por *western blot* y RT-PCR). Por inmunotinción, la CNPasa se detectaba principalmente en núcleos y en menor medida en el citoplasma, pero no se localizaba particularmente en membranas de las ADSC. Esto último sugiere que podría estar realizando funciones enzimáticas sobre nucleósidos cíclicos o catalizando la formación de microtúbulos. Los diferentes tratamientos tuvieron un efecto aparente en la distribución intracelular de esta enzima pero ninguno produjo una expresión cualitativamente similar a la de los oligodendrocitos.

La proteína básica de la mielina, MBP, tiene una baja expresión en las rADSC comparada con la de los progenitores de oligodendrocitos. Por inmunotinción se aprecia marcaje tanto en la membrana como intracelularmente. Parte de este marcaje, detectado con los distintos anticuerpos contra MBP utilizados en el presente estudio, podría deberse a la isoforma Golli, que también se expresa fuera del sistema nervioso y no tiene función en la mielina, pero los análisis por RT-PCR demostraron la presencia de isoformas no-Golli (las que se localizan en la mielina, con un predominio del isotipo 3 (17 kD)). Sin embargo, nuestros tratamientos inductores no sólo no fueron capaces de conseguir una estimulación de la expresión del RNA de MBP sino que incluso produjeron una disminución en algunos casos, como la combinación PAE.

Nuestro estudio también demuestra la expresión de MOG mediante inmunotinción, western blot y RT-PCR en rADSC. La inmunotinción muestra un marcaje localizado en la membrana. En este caso, el pretratamiento con RA parece incrementar la expresión de la proteína MOG, pero los posteriores tratamientos parecen inhibirlo. Por otra parte, también se pudo demostrar, mediante RT-PCR que las rADSC expresan al menos la isoforma DM20 de la proteína proteolípida del oligodendrocito y la proteína zero (P0) de la mielina de las células de Schwann.

Los factores de transcripción Sox10 y Olig2, de gran relevancia en la diferenciación de oligodendrocitos, como discutiremos más adelante, también se expresaban en células rADSC en bajo nivel. Ambos factores de transcripción se localizaron principalmente en el núcleo de prácticamente todas las células, de manera tenue. Los tratamientos inductores no produjeron cambios apreciables en la cantidad o distribución de Sox10. Por su parte, tanto la cantidad como la distribución intracelular de Olig2 se vieron alteradas con algunos tratamientos inductores. Así, mediante inmunofluorescencia observamos que el pretratamiento con RA intensificaba el marcaje nuclear, mientras que el tratamiento con PDGF aparentemente producía una translocación del marcaje al citoplasma y por RT-PCR pudimos observar que al cambiar las células a medio definido, la expresión de Olig2 disminuía notablemente. Desconocemos el significado de estos cambios.

1.3. ¿Tienen las ADSC capacidad de mielinizar axones?

A pesar de que las rADSC presentan muchas características moleculares de oligodendrocitos y de que nuestros tratamientos inductores parecían generar células con morfología y características de membrana similares a las de la oligodendroglía, la prueba definitiva de que estas células son auténticos oligodendrocitos sería que estas células fueran capaces de mielinizar axones. Nuestros cocultivos de DRGn con rADSC no pudieron demostrar que estas células, bien en condiciones basales o con tratamientos inductores que aumentaban la expresión de galactocerebrósido membranar, fueran capaces de mielinizar axones. Por ello, con las técnicas utilizadas hasta ahora, no podemos afirmar que los tratamientos inductores sean capaces de transdiferenciar las ADSC hacia auténticos oligodendrocitos (o células de Schwann) funcionales. Sin embargo nuestros resultados sí demuestran que las células ADSC poseen un variado repertorio de moléculas propias de los oligodendrocitos y que su expresión puede ser alterada parcialmente utilizando tratamientos que comúnmente se utilizan en la diferenciación de los oligodendrocitos a partir de progenitores.

2. Transdiferenciación glial por reprogramación directa

Como acabamos de mencionar, en contra de lo publicado en múltiples artículos que proponían el tratamiento con combinaciones o cócteles llamados “inductores de la diferenciación neural” para transdiferenciar células mesenquimales en neurales (Sanchez-Ramos *y cols.*, 2000; Woodbury *y cols.*, 2000; Safford *y cols.*, 2002; Woodbury *y cols.*, 2002; Ashjian *y cols.*, 2003; Cai *y cols.*, 2004) nuestros experimentos no permitieron demostrar que esos tratamientos fueran capaces de producir células gliales funcionales. Por el contrario, nuestros estudios parecen apuntar en la dirección de que muchos de esos trabajos previos se han basado esencialmente en la demostración de la presencia o expresión de moléculas típicas de las células neurales para afirmar que la transdiferenciación se había conseguido con sus procedimientos pero no han llegado a demostrar que hayan generado neuronas o glía funcionales.

Dos trabajos pioneros simultáneos han propuesto que se pueden generar PCOs por reprogramación directa mediante factores de transcripción a partir de células somáticas (Najm *y cols.*, 2013; Yang *y cols.*, 2013). Estos autores identificaron factores de transcripción que se encuentran altamente enriquecidos en el desarrollo de los OLs en comparación con otros linajes neurales y seleccionaron 8 ó 10 conocidos por su participación en el proceso de especificación oligodendroglial. Algunos de los factores de transcripción estudiados como Olig (Olig1 y Olig2) y

Sox10 intervienen en la especificación temprana de los OLs, mientras que otros factores como la proteína Gtx/Nkx6.2 o Zfp536 comienzan a expresarse en el momento de la diferenciación (Najm y cols., 2013; Yang y cols., 2013). Estos autores sobreexpresaron dichos genes solos y en combinaciones para tratar de obtener oligodendrocitos a partir de fibroblastos embrionarios de ratón. En ambos casos obtuvieron combinaciones de 3 transgenes que eran capaces de producir PCOs auténticos (los denominaron *iOPCs*, por *induced oligodendrocyte progenitor cells*), demostrados no sólo por su capacidad de expresar moléculas propias de oligodendrocitos, sino también de mielinizar axones *in vitro* así como *in vivo* tras su trasplante.

El grupo de P.J. Tesar (Najm y cols., 2013) concluyó que la transducción con Sox10, Olig2 y Nkx6.2 era suficiente para reprogramar fibroblastos a PCOs. En el trabajo del grupo de M. Werning, (Yang y cols., 2013) mostraron que la combinación de Sox10 con Nkx2.2, Nkx6.1, Olig2 o Zfp536 incrementaba sustancialmente la generación de PCOs y que la combinación Sox10, Olig2 y Zfp536 era suficiente para inducir PCOs con alta eficiencia. Tanto el Sox10 como el Olig2 parecen representar el denominador común esencial para el proceso de conversión. Cuando se estudiaron los factores de manera individualizada, solamente Sox10, pero no Olig2 exhibía cierta actividad inductora de PCOs por sí mismo (Yang y cols., 2013).

2.1. Transducción de factores de transcripción prooligodendrogiales en ADSC

Partiendo de estos trabajos, utilizamos los plásmidos lentivirales construidos en el laboratorio de Marius Wernig (Yang y cols., 2013) para intentar la reprogramación directa de rADSC y hADSC. En estos plásmidos los transgenes se expresan cuando el promotor es activado por un transactivador (producido en un plásmido adicional, FUW-M2rtTA) al unirse a tetraciclina, es decir, se trata de transgenes inducibles por tetraciclina o por su análogo más eficiente, doxiciclina¹.

¹ En este trabajo utilizamos la activación de los transgenes por medio de doxiciclina, un análogo de la tetraciclina. Conviene ser consciente, sin embargo, de que este antibiótico no es completamente inerte en las células. Hay estudios que demuestran que la doxiciclina mejora la supervivencia de las células sometidas a reprogramación inducible hacia células iPS debido a que activa la vía PI3K-AKT, que no sólo participa en la supervivencia celular, sino que además es crucial para la autorrenovación de las células madre pluripotentes no diferenciadas (Singh y cols., 2012). La activación de AKT es una señal de supervivencia celular común en muchos tipos de células, incluidas células madre neurales y las neuronas diferenciadas, por lo que algunos autores sugieren la utilización de doxiciclina como suplemento en los cultivos celulares (Chang MY, Rhee YH, Yi SH, Lee SJ, Kim RK, Kim H, Park CH & Lee SH. (2014). Doxycycline enhances survival and self-renewal of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **3**, 353-364.). Por otra parte, otros estudios demuestran que la doxiciclina activa la condrogénesis en células mesenquimales (Lee y cols., 2013), aunque en nuestros experimentos observamos que la estimulación de la diferenciación condrogénica en las células transducidas con SOX se produjo incluso en ausencia de

En el presente trabajo hemos utilizado combinaciones de 4 factores de transcripción: Sox10, Olig2, Nkx6.1 y/o Zfp536, a los cuales, para facilitar su denominación, abreviamos con sus iniciales S, O, N y/o Z, respectivamente.

Teniendo en cuenta tanto el número de PCOs obtenidos como el tiempo requerido para su generación, observamos que la mejor combinación para las rADSC era Sox10 + Olig2 + Zfp536 (SOZ). Con esta combinación obtuvimos células de características morfológicas y moleculares consistentes con las de los PCOs y que se marcaban con O4 que, como hemos mencionado, nunca había marcado ADSCs en nuestros estudios previos. Además, estas células proliferaban en respuesta a factores como el PDGF-AA y maduraban hacia células O1+. El anticuerpo monoclonal O4 es el primer marcador específico de superficie reconocido del linaje oligodendroglial (Gard y Pfeiffer, 1989) que reacciona con sulfátido, psichosina y con otros lípidos de membrana que se expresan específicamente en los PCOs (Schwab y Caroni, 1988).

El presente trabajo es el primero en demostrar que células somáticas de individuo adulto se pueden transdiferenciar por reprogramación directa hacia PCOs. Ambos trabajos pioneros citados utilizaron células fetales de ratón (el grupo de Wernig también utilizó fibroblastos de rata E15) para reprogramar. Teniendo en cuenta que las modificaciones epigenéticas de tales células son menos definitivas que las de un tejido adulto diferenciado, su reprogramación es probablemente mucho más rápida y eficiente. La traslación de los resultados obtenidos con células fetales a células adultas no es siempre directa ni incuestionable. Es más, la combinación de factores de transcripción que se ha de utilizar en cada caso podría incluso no ser la misma. De hecho, nuestro trabajo demuestra que la combinación SON propuesta por el grupo de Tesar (Najm y cols., 2013; Yang y cols., 2013) no generó PCOs a partir de rADSC. En contraste, la reprogramación de hADSC (humanas) hacia PCOs se consiguió con la combinación SON (estudios en marcha en nuestro laboratorio no presentados aquí). Por lo tanto, es posible que haya que modificar la combinación de factores de transcripción que se han de utilizar para obtener PCOs a partir de células somáticas dependiendo del tipo celular de partida, el estadio de diferenciación de dicho tipo celular y la especie de la que se trate.

Es importante remarcar que la adquisición de una morfología de célula refringente redondeada y con unas pocas ramificaciones que, a su vez, se ramifican, no es suficiente para definir el fenotipo oligodendroglial en las células

doxiciclina, probablemente por la expresión mínima de los transgenes en ausencia de transactivación que se conoce como "leak" ("fuga")

reprogramadas. Esta morfología puede producirse durante los pasos iniciales de la transdiferenciación, cuando se generan células redondeadas en contacto con grupos de células de aspecto mesenquimal, y que luego se disponen en la periferia de esos grupos celulares. Sin embargo no es hasta el momento en que esas células redondeadas y ramificadas se independizan de las mesenquimales, evitando su contacto, disminuyendo el tamaño del soma y el calibre de sus prolongaciones, al mismo tiempo que aumenta la ramificación de éstas, cuando esa célula empezará a ser O4+ y podrá considerarse PCO. Curiosamente, algunas combinaciones de factores de transcripción como SONZ, tanto en rADSC como en hADSC (no mostrado aquí) producen células con esa morfología ramificada y siempre en contacto con otras células del mismo tipo o de tipo mesenquimal que no llegan a mostrar marcaje con O4 tras semanas e incluso meses de cultivo continuado. Aparentemente, en este caso se trata de una retracción del citoplasma de células aplanadas que crecen en colonias pero cuyo fenotipo desconocemos.

Además de obtener células O4+, en los primeros estadios de transdiferenciación obtuvimos células que expresaban p75NTR y/o GFAP. El receptor de baja afinidad de NGF, p75NTR o CD271, se puede observar en una pequeña población de rADSC en cultivo en condiciones basales, pero tras la reprogramación puede constituir un elevado porcentaje de las células alargadas y con algunas ramificaciones, morfológicamente diferentes de las que muestra la población O4+. Este receptor se encuentra colocalizado con receptores TrkA, B o C en tipos celulares que responden a las neurotrofinas, variando su expresión a lo largo del desarrollo. En el cerebro adulto, el p75NTR caracteriza algunas neuronas colinérgicas, pero además se expresa en células madre de la zona subventricular, SVZ, simultáneamente a la isoforma β de GFAP (van Strien y cols., 2014). Por otra parte, su expresión se induce en los PCOs alrededor de las áreas de desmielinización (Petratos y cols., 2004) y se ha observado en oligodendrocitos humanos en cultivo (Ladiwala y cols., 1998). En el sistema nervioso periférico, el p75NTR se utiliza como marcador de células progenitoras de cresta neural y de las células de Schwann no mielinizantes en el nervio y en cultivo (coexpresando, a menudo, GFAP (Jessen y cols., 1984)), así como en sus homólogos en el bulbo olfatorio, las células de glía envolvente (Ramon-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992). El GFAP, por su parte, es el marcador de la astrogλία, particularmente de la astrogλία reactiva, aunque, como acabamos de ver, también se puede expresar en algunas células progenitoras del sistema nervioso periférico y en la glía envolvente.

A medida que iba madurando el cultivo, el número de células que expresaba p75NTR y GFAP iba disminuyendo, aunque en ningún caso llegaron a desaparecer.

Las células O1+ maduras ya no expresaban GFAP y, de hecho, la tinción de O1 y GFAP marcaban células con morfología diferente y separadas entre sí. Para el presente trabajo no hemos realizado un estudio en detalle del tipo celular definido por estas células, si se trata de astrocitos o de tipos celulares periféricos, su capacidad de mielinización (con o sin lámina basal) o incluso de diferenciación hacia derivados de cresta neural, incluyendo neuronas, ni su relación con los oligodendrocitos, pues estimamos que tal estudio supondría otra tesis doctoral por sí mismo.

La expresión de otras moléculas relacionadas con la oligodendroglía en las rADSC reprogramadas con SOZ se demostró principalmente mediante RT-PCR. Así, se pudo demostrar que estas células expresaban mRNAs de Sox2, CNPasa, MOG, MBP y proteína proteolípidica. Este último resultado nos proporciona una de las más claras demostraciones de la transdiferenciación de las células mesenquimales a oligodendrocitos pues las células reprogramadas no sólo expresan la isoforma DM20, ya presente en las ADSC en condiciones basales, sino también la isoforma PLP1, propia de la mielina del sistema nervioso central y escasamente expresada en el sistema nervioso periférico. La expresión de DM20 se relaciona con etapas más tempranas en el desarrollo de los oligodendrocitos. Por lo contrario, el PLP1 se expresa en etapas más maduras, cuando las células son capaces de mielinizar (Dubois-Dalcq y cols., 1986; Timsit y cols., 1992; Timsit y cols., 1995; Fanarraga y cols., 1996). Mediante RT-PCR pudimos comprobar también la elevada expresión de Sox10 y Olig2, esperable debido a la transducción de esos genes como parte del combinado de factores de transcripción para la reprogramación.

2.2. Selección de precursores de oligodendrocitos transdiferenciados

En el presente trabajo hemos intentado varios métodos para obtener cultivos puros de PCOs transdiferenciados. Por una parte, realizamos una selección inmunomagnética de las células que reaccionaban con el anticuerpo monoclonal O4, como paradigma del fenotipo de precursor oligodendrocítico. Sin embargo, pudimos apreciar que los cultivos enriquecidos en células O4+ no se mantenían en este fenotipo y que, en cambio, en el cultivo depletado de células O4+ aparecían rápidamente nuevas células con este marcador hasta llegar con el tiempo a purezas similares a las del cultivo enriquecido. Esto nos sugirió, por una parte, que la población O4- contiene células capaces de generar PCO, pero además, por otra parte, que células O4- actúan como soporte de las O4+, bien trófico o bien

estimulando su proliferación, y que, si desaparecen, los PCO entran en quiescencia o mueren. Por ello, conviene mantener hasta el final del experimento el cultivo mixto de células transdiferenciadas y células no transdiferenciadas. En caso de necesitar las células para remielinizar axones desmielinizados, por ejemplo, se podrían seleccionar justo antes del trasplante. En este caso, sin embargo, podría ser más beneficioso un trasplante mixto de células reprogramadas que contenga células mesenquimales debido a que las características tróficas e inmunomoduladoras de éstas podría incrementar la eficiencia de la remielinización. Estos resultados, además, apoyan la utilización de células mesenquimales, en nuestro caso ADSC, como fuente celular para la reprogramación, pues las células no reprogramadas parecen beneficiar en múltiples aspectos a las transdiferenciadas.

Criterios semejantes se pueden utilizar para descartar la selección de las células que no habían incorporado los transgenes de reprogramación mediante el antibiótico zeocina (los plásmidos que contenían los transgenes conferían también resistencia a este antibiótico). No obtuvimos ventajas tras su utilización y, por el contrario, gran parte de las células del cultivo presentaban signos de toxicidad a largo plazo, incluso con las bajas dosis utilizadas.

Los cultivos reprogramados se mantuvieron en crecimiento durante periodos de hasta 7 meses, lo cual excede en mucho el tiempo esperable para la senescencia celular en condiciones basales de cultivo de las rADSC, las cuales, a partir de la 4ª semana disminuyen su proliferación y adquieren morfologías de células aplanadas, gigantes, con gruesos haces de citoesqueleto y, a menudo, multinucleadas. Por lo tanto, es posible que las células que siguen proliferando después de meses en el cultivo reprogramado, aún cuando tengan una morfología aplanada y poligonal o alargada que nos pudiera sugerir que se trata de células mesenquimales, pudieran tratarse de células transducidas con sólo uno o dos de los transgenes y que su expresión las mantenga en proliferación. Hemos podido observar tinción de núcleos anti-Sox10 o anti-Olig2 en células O4- en nuestros cultivos reprogramados (no disponemos de anti-Zfp536), lo cual podría apoyar este punto. Sea como fuere, es difícil que las células originales constituyan una población relevante del cultivo al cabo de 3-5 meses, lo que resta interés a la selección por antibiótico.

Indirectamente, los experimentos de inmunoselección magnética apoyaban la hipótesis de que las células O1+ que se obtienen en los cultivos reprogramados proceden de las células O4+, pues la aparición de éstas precede a la de aquéllas en los cultivos derivados de la inmunoselección negativa, y las O1+ aumentan en

número en mayor proporción que las O4 en los cultivos derivados de la inmunoselección positiva. No provienen, en cambio, de la población p75NTR+ pues ésta es muy abundante en la fracción negativa, donde no se observan inicialmente células O1+. Las células de la fracción negativa que dieron lugar a las células O4+, dada la rapidez con la que aparecen éstas en el cultivo (un 14.4% en nuestro experimento al cabo de una semana), podrían estar ya comprometidas al linaje oligodendrocítico, por lo que podría tratarse de progenitores de oligodendrocito o preoligodendrocitos, células NG2+/O4- o quizá A2B5+. No hemos podido comprobar este aspecto pues las células rADSC expresan NG2 mayoritariamente en condiciones basales de cultivo, por lo que no podríamos distinguir el fenotipo preoligodendrocítico. De manera similar, las células rADSC tienen una tinción intracelular elevada cuando se reaccionan con el anticuerpo monoclonal A2B5 (no mostrado aquí, por considerarlo una reacción inespecífica aunque muy intensa), lo cual no impide técnicamente distinguir las células que presenten el gangliósido de membrana típico de los progenitores bipotentes O2A.

2.3. Inclusión de pretratamientos en los procedimientos de transdiferenciación por reprogramación directa

En el transcurso de los primeros experimentos de reprogramación observamos que la vía condrogénica de diferenciación espontánea parecía favorecida en las rADSC transducidas con factores de transcripción. Cuando dichas células que ya sobreexpresaban los factores de transcripción SOX se sometieron a los procedimientos clásicos de diferenciación hacia célula mesodérmica, pudimos comprobar que ciertamente tenían facilidad para convertirse en condrocitos, mientras que la vía adipogénica y osteogénica parecía inhibida. Hipotetizamos que este efecto podría ser debido a que la sobreexpresión de Sox10, factor de transcripción incluido entre los transgenes transfectados era la causante, pues éste puede actuar sobre los sitios de unión en el genoma de su hermano Sox9, que es un factor de transcripción clave en la condrogénesis(Akiyama y *cols.*, 2002).

Por ello, planteamos realizar una serie de pretratamientos a las células que ya habían sido infectadas lentiviralmente para introducirles los transgenes pero aún no habían sido activadas con la doxiciplina, de tal manera que la sobreexpresión de los factores de transcripción ocurriera en un tipo celular menos propenso a la diferenciación condrogénica. Así, probamos ácido retinoico, como agente neuralizador, inducción adipogénica y/o tratamiento con RepSox, como molécula facilitadora de la pluripotencia.

Pretratamiento adipogénico

El pretratamiento que denominamos “adipogénico”, que se realizó durante 5 días previos a la activación de los transgenes con doxíciclina, tuvo efectos morfológicos casi inmediatos, produciendo células redondeadas y ramificadas (lo que muchos artículos describen como “neuronales”), aunque más grandes que los oligodendrocitos. Distintos procedimientos de cultivo se han utilizado para inducir la diferenciación de ASDC a células neuronales. Se ha demostrado que las rADSC tratadas con isobutilmetilxantina (IBMX), componente del cóctel adipogénico, pueden diferenciarse a células de morfología similar a neuronas *in vitro*. El IBMX, al igual que el DMSO, también presente en el cóctel adipogénico clásico, produce la ruptura del citoesqueleto de actina dando lugar a una retracción de la célula (Woodbury y cols., 2000; Woodbury y cols., 2002). Hay trabajos en los que afirman conseguir neuronas con estos dos compuestos, basándose en la morfología de las células y en la expresión de algunos marcadores propios de células neuronales. Ya hemos mencionado en el presente trabajo que la presencia de un subconjunto de marcadores no demuestra el compromiso neural de una célula, que sólo puede confirmarse cuando se demuestra que esa célula cumple las funciones del tipo celular que se propone, por lo que estos trabajos nos parecen poco creíbles. No obstante, aunque estos compuestos no sean capaces de transdiferenciar las ADSC a células tipo neural, sí pueden producir efectos que faciliten su reprogramación. Por ejemplo el DMSO, que es un solvente anfipático y un crioprotector celular ampliamente utilizado, inhibe la expresión de c-myc y aumenta los niveles de cAMP. El IBMX actúa también aumentando el AMP cíclico intracelular mediante la inhibición de la fosfodiesterasa y la indometacina potencia la actividad del IBMX a través de la vía de la ciclooxygenasa (Ying y cols., 2012). En el presente estudio, hemos podido observar que el pretratamiento que denominamos “adipogénico”, por contener IBMX e indometacina, mejora el rendimiento de la reprogramación al aumentar el enriquecimiento de los cultivos en células O4+ y la durabilidad de este enriquecimiento. Desconocemos los mecanismos moleculares por los que se produce esta mejora del rendimiento de la reprogramación. Una explicación podría ser que este pretratamiento retiraría a las células mesenquimales de la vía condrogénica, evitando con ello que el Sox10 potencie dicho fenotipo en lugar del oligodendrogial. Aunque estudios futuros tendrán que profundizar en los mecanismos intracelulares que predisponen a la transdiferenciación oligodendrogial de las ADSC por reprogramación celular, el presente trabajo sugiere la implicación del aumento del cAMP intracelular en este proceso.

Conviene hacer notar, no obstante, que los procedimientos para obtener transdiferenciación de rADSC a oligodendrocitos no son directamente aplicables a las ADSC humanas, pues ni el pretratamiento adipogénico (IBMX e Indometacina) produjo cambios morfológicos tempranos en este tipo celular como lo hacía en las células de rata (tampoco el tratamiento con dbcAMP altera la morfología de las hADSC), ni, como hemos mencionado anteriormente, la combinación de factores de transcripción que conseguía reprogramar las rADSC era la más efectiva en hADSC.

Pretratamiento con ácido retinoico

El ácido retinoico *all-trans* (RA) es utilizado para el control de la identidad de células neurales derivadas de células madre embrionarias (Okada *y cols.*, 2004) siendo uno de los morfógenos más conocidos y más ampliamente empleado en biología del desarrollo por producir “neuralización” de estructuras desdiferenciadas. Su distribución embrionaria se correlaciona con la diferenciación neural y con la especificación posicional en el sistema nervioso central en desarrollo. Promueve la diferenciación de células madre embrionarias hacia neuroectodermo, e inhibe las vías de señalización de Wnt y Nodal evitando su destino mesodérmico durante la diferenciación en la capa germinal (Engberg *y cols.*, 2010). La concentración de RA regula estricta y simultáneamente la neuralización y la especificación de posición antero-posterior durante la diferenciación del embrión. El gradiente de RA también determina la identidad ventro-dorsal, de manera que concentraciones mayores de RA inducen un fenotipo dorsal y concentraciones menores, un fenotipo ventral, a través de una mayor expresión de la proteína sonic hedgehog N-terminal (Shh-N) (Okada *y cols.*, 2004).

En los estudios inmunocitoquímicos de las células reprogramadas con la combinación SOZ sometidas a pretratamiento de RA, observamos que éstas podían expresar O4, p75NTR y GFAP pero requerían tiempos más prolongados para mostrar marcaje con O1 que las no pretratadas o que las pretratadas con cóctel adipogénico. Mediante RT-PCR se pudo demostrar la expresión de mRNAs de Sox2, CNPasa, MOG o MBP. Sin embargo las células pretratadas con RA solo expresaban DM20 y no PLP1, por lo que podemos suponer que las células reprogramadas en esta condición son más inmaduras que las obtenidas con pretratamiento adipogénico. Además, tampoco se obtuvieron suficiente cantidad de células reprogramadas para probar su funcionalidad, ya que los PCOs generados terminaban por desaparecer y las células con aspecto mesenquimal sobrepoblaron el cultivo.

La combinación de ambos pretratamientos, adipogénico seguido o precedido de RA, tampoco mejoró la eficiencia de producción de PCOs conseguida con el pretratamiento adipogénico solo.

Es de destacar, por otra parte, que en los cultivos de rADSC transducidos con SONZ el pretratamiento con RA sí aumentó la eficiencia de generación de células O4+. Sin embargo, estas células no mostraban la morfología típica de los PCOs, ni tampoco las células O1+ tenían la morfología típica de oligodendrocitos. Además, estos cultivos reprogramados con SONZ tenían una duración limitada y las células oligodendrogiales desaparecían hacia los 3 meses de cultivo. Este procedimiento de reprogramación no es, por lo tanto, adecuado para obtener células oligodendrogiales. En cambio, dada la expresión de p75NTR en gran número de células, convendría realizar un estudio más detallado sobre la posibilidad de generar derivados de cresta neural (células de Schwann o incluso neuronas sensoriales) o de glía envolvente utilizando células ADSC reprogramadas con SONZ y previamente tratadas con RA.

Pretratamiento con RepSox

El RepSox es una molécula de pequeño tamaño que inhibe la vía de señalización del TGF β en cultivos de células que se encuentran parcialmente reprogramadas. Hay estudios recientes (Ichida y cols., 2009) en los que se muestra que el RepSox permite la generación de células iPS a partir de fibroblastos adultos y embrionarios con una frecuencia comparable a la de la transducción con Sox2 y se ha propuesto que el RepSox puede reemplazar a este factor de transcripción (de ahí su nombre) en la combinación de Yamanaka. Los autores confirmaron que el RepSox no sustituye en realidad a Sox2, ya que no observaron ningún incremento de su nivel de expresión endógena ni del de otros miembros de la familia SoxB, y sugirieron que este compuesto hace las funciones de Sox2 en reprogramación a través de la inducción de Nanog (Ichida y cols., 2009). En estos trabajos también se demostró que el RepSox sustituía funcionalmente a otro de los factores de la combinación de Yamanaka para reprogramación hacia células pluripotentes, el cMyc. Estos estudios demuestran la viabilidad de sustituir ciertos transgenes necesarios para la reprogramación por pequeñas moléculas que modulan vías celulares endógenas.

En nuestros estudios, sin embargo, tras el tratamiento con RepSox no se llegaron a conseguir células O4+ en rADSC transducidas con SOZ (por lo que este dato no se expresa en la sección de resultados). No obstante, quisimos probar la

combinación del pretratamientos con RepSox y RA o factores adipogénicos. Ambas combinaciones RepSox/RA y RepSox/adipogénico generaron células O4+, p75NTR+ y O1+, pero no mejoraron el rendimiento que se observaba tras el pretratamiento adipogénico solo.

A modo de resumen, todos estos resultados nos indican que la eficiencia en la transdiferenciación de rADSC hacia PCOs mediante reprogramación directa con la combinación SOZ mejoraba al aplicar a las células un tratamiento adipogénico de corta duración previo a la activación de los transgenes. Esta eficiencia no pudo ser mejorada por otros pretratamientos o combinaciones de pretratamientos aquí probados. Tanto en el caso de las células sin tratamiento previo como en las que tuvieron pretratamiento adipogénico obtuvimos el mismo desarrollo final de las células, pero en el caso de las células con pretratamiento adipogénico el desarrollo fue más rápido y se obtuvo un mayor número de células positivas para O4 y O1. En ambos casos, además, se observó la expresión de los mRNA de Sox2, CNPasa, MBP, MOG, PLP1 y Olig2, genes que participan en el desarrollo, identidad y funcionalidad de los oligodendrocitos. Sox2 es uno de los factores de transcripción expresados de forma temprana en el tubo neural en desarrollo, y es esencial para el mantenimiento de células madre neurales multipotentes, ya que inhibe la diferenciación neural manteniendo las características progenitoras (Graham y cols., 2003). La CNPasa es una proteína que constituye el 4% de las proteínas de la mielina en el oligodendrocito aunque su función no ha sido aún determinada claramente. Por otro lado la proteína MBP es la proteína más abundante en la mielina, tanto de oligodendrocitos como de células de Schwann. MOG, en cambio, es una glicoproteína minoritaria de la mielina que se encuentra exclusivamente en oligodendrocitos. El PLP1, como se ha dicho más arriba, es una proteína mayoritaria que desempeña un papel esencial en la compactación estabilización y mantenimiento de la mielina de oligodendrocitos. El factor de transcripción Olig2, utilizado en la reprogramación, está predominantemente restringido al sistema nervioso central, donde es esencial durante el desarrollo de las motoneuronas espinales y de los oligodendrocitos y está expresado nuclearmente en oligodendrocitos del cerebro humano adulto. Todo ello confirma la identidad oligodendroglial de las células reprogramadas.

2.4. Funcionalidad de los oligodendrocitos obtenidos por transdiferenciación de rADSC

La función más destacada de los oligodendrocitos es su capacidad de mielinizar axones. Aunque, como se menciona en la introducción, también existen oligodendrocitos perineuronales y perivasculares con una función de soporte aún por definir, los oligodendrocitos intrafasciculares tienen la misión de generar una envoltura aislante, la mielina, que permita la transmisión del impulso nervioso de manera fiel, a largas distancias. En el presente trabajo hemos realizado, a modo de *prueba de concepto*, experimentos destinados a comprobar si las células generadas por reprogramación celular producían envolturas mielínicas en cultivo, de tal manera que demostráramos que eran auténticos oligodendrocitos. Utilizamos como fuente de axones los de neuronas de ganglios sensoriales de rata, que tienen una rama periférica, mielinizada por células de Schwann, y una rama que recorre la médula espinal, mielinizada por oligodendrocitos. En cultivo, los axones de estas neuronas son efectivamente mielinizados por oligodendrocitos. Para evitar la competición y posible inhibición por las células de Schwann, los cultivos de estas neuronas, obtenidos de ganglios dorsales, se trataron con antimitóticos que eliminaron la mayor parte de las células proliferantes, aunque podían persistir algunos fibroblastos y células de Schwann remanentes.

A diferencia de los experimentos de cocultivo de DRGn con células rADSC sometidas a tratamiento farmacológico de inducción donde, como hemos mencionado no se observaron signos de mielina, el cocultivo de neuronas con las células reprogramadas con SOZ generó numerosos perfiles de extensión citoplásmica de las células transdiferenciadas sobre los axones. Aunque la demostración de la producción de mielina sólo se puede hacer con total seguridad mediante observación al microscopio electrónico de transmisión, las imágenes obtenidas en microscopio confocal muestran cómo el citoplasma teñido de las células transdiferenciadas rodea el axón, lo que implica que, al menos, estas células lo envuelven, aunque no sabemos aún con cuántas vueltas o cuán compactadas están. Es de destacar, sin embargo que cada célula transdiferenciada se relaciona con varios axones en cultivo, siguiendo trayectorias diferentes, durante tramos rectos de longitud variable pero a menudo superando los 100 μm . En ocasiones, incluso, donde los axones cambian de dirección en ángulo recto, las células transdiferenciadas siguen fielmente la nueva trayectoria. Todo esto confirma que el contacto de las células transdiferenciadas con los axones es íntimo y específico, como lo es la mielina.

Una observación no presentada en los resultados es la afinidad de las células reprogramadas por agregados de neuronas sensoriales, formando una cápsula compacta a su alrededor (lo cual, a menudo, produce que éstos se despeguen del sustrato), que podrían corresponderse con los oligodendrocitos perineuronales. La microscopía electrónica de transmisión podrá comprobar este aspecto.

Finalmente, hemos tratado algunos cocultivos con benztropina, un antagonista de los receptores muscarínicos M1 y/o M3, y que se ha demostrado recientemente que estimula la diferenciación de los progenitores de OLs *in vitro* y la remielinización de zonas desmielinizadas cuando se administra a un animal *in vivo* (Deshmukh y cols., 2013). Nuestros experimentos muestran que los cocultivos tratados con benztropina presentaban una mayor madurez de las células O1+ con ramificaciones más profusas y extensiones más numerosas y largas sobre los axones. Esto, aparte de proporcionar una herramienta para estimular la mielinización *in vitro*, refuerza la hipótesis de que nuestras células transdiferenciadas son auténticos oligodendrocitos, ya que responden como éstos a estímulos farmacológicos específicos.

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos concluir que se pueden generar precursores de oligodendrocitos funcionales mediante reprogramación directa de las ADSC de rata con los factores de transcripción Sox10, Olig2 y Zfp536.

Conclusiones

1. En condiciones basales de cultivo las ADSC de rata expresan, de forma espontánea, marcadores típicos oligodendrogiales como galactocerebrósido, Olig2, Sox10, CNPasa, MOG, DM20 y MBP.
2. El tratamiento de estas células mesenquimales de rata con combinaciones que incluyen ácido retinoico, dibutiril AMP cíclico y factores como EGF, FGFb y/o PDGF produce un gran aumento en el número de células que expresan galactocerebrósido. Sin embargo, la manifestación de ésta y de otras características moleculares de oligodendrocitos, no implica que posean funcionalidad como tales.
3. Las ADSC de rata transdiferenciadas por reprogramación directa con los factores de transcripción Sox10, Olig2 y Zfp536 originan precursores de oligodendrocitos caracterizados por su morfología y su marcaje con el anticuerpo monoclonal O4. Estas células pueden llegar a representar más de un 70% de la población celular del cultivo.
4. Las células transdiferenciadas dan lugar a oligodendrocitos con marcaje O1+, MAG+, MOG+, MBP+ y que expresan todas sus características moleculares, incluyendo PLP1. Además el cultivo reprogramado genera células con morfología astrocitaria que expresan GFAP y células con morfologías alargadas que expresan p75NTR.
5. La aplicación de factores que inducen la adipogénesis previamente a la activación de los factores de transcripción mejora el rendimiento de la transdiferenciación de las ADSC de rata hacia oligodendrocitos.
6. Los oligodendrocitos generados por transdiferenciación de las ADSC de rata mediante reprogramación directa con factores de transcripción muestran capacidad de mielinización de axones *in vitro*. La adición de benztropina estimula la maduración de estos oligodendrocitos en cultivo y podría potenciar su capacidad mielinizante.

Referencias bibliográficas

- Aggarwal S & Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-1822.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A & de Crombrughe B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* **16**, 2813-2828.
- Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF, Bloch JJ, Deglon N, Kostic C, Zurn A & Aebischer P. (2001). Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp Neurol* **170**, 48-62.
- Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P & Hedrick MH. (2003). In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* **111**, 1922-1931.
- Aubert J, Stavridis MP, Tweedie S, O'Reilly M, Vierlinger K, Li M, Ghazal P, Pratt T, Mason JO, Roy D & Smith A. (2003). Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox1-gfp knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11836-11841.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C & Prockop DJ. (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3908-3913.
- Bae KS, Park JB, Kim HS, Kim DS, Park DJ & Kang SJ. (2011). Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* **52**, 401-412.
- Baer PC & Geiger H. (2012). Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* **2012**, 812693.
- Barres BA & Raff MC. (1994). Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron* **12**, 935-942.
- Barres BA & Raff MC. (1999). Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* **147**, 1123-1128.
- Baumann N & Pham-Dinh D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871-927.
- Ben-Hur T, Rogister B, Murray K, Rougon G & Dubois-Dalcq M. (1998). Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci* **18**, 5777-5788.
- Berger J & Gartner J. (2006). X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1721-1732.
- Besnard F, Brenner M, Nakatani Y, Chao R, Purohit HJ & Freese E. (1991). Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J Biol Chem* **266**, 18877-18883.
- Birnboim HC & Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H & Noble M. (1990). Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6368-6372.
- Bradl M & Lassmann H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 37-53.
- Braun J, Kurtz A, Barutcu N, Bodo J, Thiel A & Dong J. (2013). Concerted regulation of CD34 and CD105 accompanies mesenchymal stromal cell derivation from human adventitial stromal cell. *Stem Cells Dev* **22**, 815-827.
- Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID & McKay RD. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* **285**, 754-756.
- Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S & Stevenson M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6580-6584.

- Burgisser P, Althaus HH, Rohmann A & Neuhoﬀ V. (1988). Lipid synthesis by oligodendrocytes from adult pig brain maintained in long-term culture. *Neurochem Int* **13**, 111-118.
- Butt AM, Duncan A, Hornby MF, Kirvell SL, Hunter A, Levine JM & Berry M. (1999). Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. *Glia* **26**, 84-91.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ & Barres BA. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* **28**, 264-278.
- Cai J, Cheng A, Luo Y, Lu C, Mattson MP, Rao MS & Furukawa K. (2004). Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem* **88**, 212-226.
- Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M & Qiu M. (2005). Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron* **45**, 41-53.
- Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzskova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, Sotnikova TD, Menegon A, Roncaglia P, Colciago G, Russo G, Carninci P, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Gustincich S, Dityatev A & Broccoli V. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* **476**, 224-227.
- Caplan AI. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**, 641-650.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V & Uccelli A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367-372.
- Coutts DJ, Humphries CE, Zhao C, Plant GW & Franklin RJ. (2013). Embryonic-derived olfactory ensheathing cells remyelinate focal areas of spinal cord demyelination more efficiently than neonatal or adult-derived cells. *Cell Transplant* **22**, 1249-1261.
- Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, Ijzermans JN, Weimar W & Hoogduijn MJ. (2010). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev* **19**, 1843-1853.
- Chan TM, Chen JY, Ho LI, Lin HP, Hsueh KW, Liu DD, Chen YH, Hsieh AC, Tsai NM, Hueng DY, Tsai ST, Chou PW, Lin SZ & Harn HJ. (2014). ADSC Therapy in Neurodegenerative Disorders. *Cell Transplant* **23**, 549-557.
- Chandler CE, Parsons LM, Hosang M & Shooter EM. (1984). A monoclonal antibody modulates the interaction of nerve growth factor with PC12 cells. *J Biol Chem* **259**, 6882-6889.
- Chang MY, Rhee YH, Yi SH, Lee SJ, Kim RK, Kim H, Park CH & Lee SH. (2014). Doxycycline enhances survival and self-renewal of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **3**, 353-364.
- Chase LG, Lakshminpathy U, Solchaga LA, Rao MS & Vemuri MC. (2010). A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* **1**, 8.
- Cheng L, Hu W, Qiu B, Zhao J, Yu Y, Guan W, Wang M, Yang W & Pei G. (2014). Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* **24**, 665-679.
- da Silva Meirelles L, Caplan AI & Nardi NB. (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**, 2287-2299.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC & Nardi NB. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **119**, 2204-2213.
- Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF & Muller D. (2004). Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* **167**, 935-944.
- Davidoff MS, Middendorff R, Pusch W, Muller D, Wichers S & Holstein AF. (1999). Sertoli and Leydig cells of the human testis express neurofilament triplet proteins. *Histochem Cell Biol* **111**, 173-187.
- de Castro F & Bribian A. (2005). The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Brain Res Rev* **49**, 227-241.

- Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, Ratliff J & Isacson O. (1998). Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol* **149**, 28-41.
- Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML & Laywell ED. (2006). Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* **24**, 1054-1064.
- Deshmukh VA, Tardif V, Lyssiotis CA, Green CC, Kerman B, Kim HJ, Padmanabhan K, Swoboda JG, Ahmad I, Kondo T, Gage FH, Theofilopoulos AN, Lawson BR, Schultz PG & Lairson LL. (2013). A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature* **502**, 327-332.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S & Gianni AM. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838-3843.
- Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C & Noel D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* **25**, 2025-2032.
- Doucette JR, Kiernan JA & Flumerfelt BA. (1983). The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory axons in the central or peripheral nervous system. *J Anat* **137 (Pt 1)**, 1-19.
- Doucette R & Devon R. (1995). Elevated intracellular levels of cAMP induce olfactory ensheathing cells to express GAL-C and GFAP but not MBP. *Glia* **13**, 130-140.
- Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L & Lazzarini RA. (1986). Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* **102**, 384-392.
- Dugas JC, Tai YC, Speed TP, Ngai J & Barres BA. (2006). Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* **26**, 10967-10983.
- Dyer CA & Benjamins JA. (1990). Glycolipids and transmembrane signaling: antibodies to galactocerebroside cause an influx of calcium in oligodendrocytes. *J Cell Biol* **111**, 625-633.
- Dyer CA & Benjamins JA. (1991). Galactocerebroside and sulfatide independently mediate Ca²⁺ responses in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* **30**, 699-711.
- Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA & Griffiths IR. (2004). Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* **166**, 121-131.
- Eglitis MA & Mezey E. (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4080-4085.
- Eisenbarth GS, Walsh FS & Nirenberg M. (1979). Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4913-4917.
- Engberg N, Kahn M, Petersen DR, Hansson M & Serup P. (2010). Retinoic acid synthesis promotes development of neural progenitors from mouse embryonic stem cells by suppressing endogenous, Wnt-dependent nodal signaling. *Stem Cells* **28**, 1498-1509.
- Fanarraga ML, Dickinson PJ, Sommer I, Montague P, Kyriakides E & Griffiths IR. (1996). Evidence that some oligodendrocyte progenitors in the developing optic pathway express the plp gene. *Glia* **18**, 282-292.
- Fancy SP, Zhao C & Franklin RJ. (2004). Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* **27**, 247-254.
- Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, Cantarelli Machado D & Pegas Henriques JA. (2009). Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation* **77**, 221-228.
- Franklin RJ & Ffrench-Constant C. (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* **9**, 839-855.

- Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il & Petrakova KV. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* **16**, 381-390.
- Gage FH, Ray J & Fisher LJ. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* **18**, 159-192.
- Garbay B, Heape AM, Sargueil F & Cassagne C. (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* **61**, 267-304.
- Gard AL & Pfeiffer SE. (1989). Oligodendrocyte progenitors isolated directly from developing telencephalon at a specific phenotypic stage: myelinogenic potential in a defined environment. *Development* **106**, 119-132.
- Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A & Rohrich RJ. (2012). Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast Reconstr Surg* **129**, 1277-1290.
- Gong Z, Calkins G, Cheng EC, Krause D & Niklason LE. (2009). Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* **15**, 319-330.
- Gower RM, Boehler RM, Azarin SM, Ricci CF, Leonard JN & Shea LD. (2014). Modulation of leukocyte infiltration and phenotype in microporous tissue engineering scaffolds via vector induced IL-10 expression. *Biomaterials* **35**, 2024-2031.
- Graham V, Khudiyakov J, Ellis P & Pevny L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**, 749-765.
- He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, Shi Y, Nave KA & Casaccia-Bonnel P. (2007). The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* **55**, 217-230.
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R & Storch A. (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* **117**, 4411-4422.
- Hickey WF. (1999). The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J Neuroimmunol* **98**, 37-44.
- Hockfield S & McKay RD. (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* **5**, 3310-3328.
- Hornig J, Frob F, Vogl MR, Hermans-Borgmeyer I, Tamm ER & Wegner M. (2013). The transcription factors Sox10 and Myrf define an essential regulatory network module in differentiating oligodendrocytes. *PLoS Genet* **9**, e1003907.
- Howng SY, Avila RL, Emery B, Traka M, Lin W, Watkins T, Cook S, Bronson R, Davisson M, Barres BA & Popko B. (2010). ZFP191 is required by oligodendrocytes for CNS myelination. *Genes Dev* **24**, 301-311.
- Hu BY, Du ZW & Zhang SC. (2009). Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **4**, 1614-1622.
- Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL & Eggan K. (2009). A small-molecule inhibitor of tgfbeta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* **5**, 491-503.
- Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG & Srivastava D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142**, 375-386.
- Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG, Greer CA & Kocsis JD. (1998). Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *J Neurosci* **18**, 6176-6185.
- Jessen KR & Mirsky R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* **6**, 671-682.
- Jessen KR, Thorpe R & Mirsky R. (1984). Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J Neurocytol* **13**, 187-200.

- Joubert L, Foucault I, Sagot Y, Bernasconi L, Duval F, Alliod C, Frossard MJ, Pescini Gobert R, Curchod ML, Salvat C, Nichols A, Pouly S, Rommel C, Roach A & Hooft van Huijsduijnen R. (2010). Chemical inducers and transcriptional markers of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci Res* **88**, 2546-2557.
- Kaka GR, Tiraihi T, Delshad A, Arabkheradmand J & Kazemi H. (2012). In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as inducer. *Int J Neurosci* **122**, 237-247.
- Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T & Okano H. (2000). Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci* **22**, 139-153.
- Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J, Popescu IR, Dufour J, Belousov A & Bunnell BA. (2004). Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. *Journal of Cell Science* **117**, 4289-4299.
- Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim YG & Kim CH. (2006). Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev* **15**, 583-594.
- Keirstead HS, Ben-Hur T, Rogister B, O'Leary MT, Dubois-Dalcq M & Blakemore WF. (1999). Polysialylated neural cell adhesion molecule-positive CNS precursors generate both oligodendrocytes and Schwann cells to remyelinate the CNS after transplantation. *J Neurosci* **19**, 7529-7536.
- Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M & Richardson WD. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* **9**, 173-179.
- Kiernan BW, Gotz B, Faissner A & ffrench-Constant C. (1996). Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms. *Mol Cell Neurosci* **7**, 322-335.
- Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M & Terenghi G. (2007). Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* **207**, 267-274.
- Kleitman N, Wood PM & Bunge RP. (1991). Tissue culture methods for the study of myelination, in *Culturing nerve cells*. ed. Bnker G & Goslin K, pp. 337-377.
- Kopen GC, Prockop DJ & Phinney DG. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10711-10716.
- Ladiwala U, Lachance C, Simoneau SJ, Bhakar A, Barker PA & Antel JP. (1998). p75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes: signaling without cell death in response to NGF. *J Neurosci* **18**, 1297-1304.
- Lamoury FM, Croitoru-Lamoury J & Brew BJ. (2006). Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytotherapy* **8**, 228-242.
- Laule C, Vavasour IM, Kolind SH, Li DK, Traboulsee TL, Moore GR & MacKay AL. (2007). Magnetic resonance imaging of myelin. *Neurotherapeutics* **4**, 460-484.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM & McKay RD. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18**, 675-679.
- Lee Y, Messing A, Su M & Brenner M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* **56**, 481-493.
- Lemke G, Lamar E & Patterson J. (1988). Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron* **1**, 73-83.
- Lewis P, Hensel M & Emerman M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* **11**, 3053-3058.
- Li H, Lu Y, Smith HK & Richardson WD. (2007). Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive myelin basic protein transcription in oligodendrocytes. *J Neurosci* **27**, 14375-14382.

- Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, Louis DN, Stiles CD & Rowitch DH. (2004). The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 499-509.
- Liu X, Sun H, Qi J, Wang L, He S, Liu J, Feng C, Chen C, Li W, Guo Y, Qin D, Pan G, Chen J, Pei D & Zheng H. (2013). Sequential introduction of reprogramming factors reveals a time-sensitive requirement for individual factors and a sequential EMT-MET mechanism for optimal reprogramming. *Nat Cell Biol* **15**, 829-838.
- Liu Z, Hu X, Cai J, Liu B, Peng X, Wegner M & Qiu M. (2007). Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms. *Dev Biol* **302**, 683-693.
- Lu P, Blesch A & Tuszynski MH. (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* **77**, 174-191.
- Lu P, Jones LL & Tuszynski MH. (2005). BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp Neurol* **191**, 344-360.
- Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD & Rowitch DH. (2002). Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* **109**, 75-86.
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD & Rowitch DH. (2000). Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25**, 317-329.
- Ludwin SK. (1979). The perineuronal satellite oligodendrocyte. A role in remyelination. *Acta Neuropathol* **47**, 49-53.
- Luo YC, Zhang HT, Cheng HY, Yang ZJ, Dai YW & Xu RX. (2010). Differentiation of cryopreserved human umbilical cord blood-derived stromal cells into cells with an oligodendrocyte phenotype. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **46**, 585-589.
- Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F & Locatelli F. (2005). Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* **90**, 516-525.
- Marconi S, Bonaconsa M, Scambi I, Squintani GM, Rui W, Turano E, Ungaro D, D'Agostino S, Barbieri F, Angiari S, Farinazzo A, Constantin G, Del Carro U, Bonetti B & Mariotti R. (2013). Systemic treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates clinical and pathological features in the amyotrophic lateral sclerosis murine model. *Neuroscience* **248C**, 333-343.
- Marigo I & Dazzi F. (2011). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. *Semin Immunopathol* **33**, 593-602.
- Marmur R, Mabie PC, Gokhan S, Song Q, Kessler JA & Mehler MF. (1998). Isolation and developmental characterization of cerebral cortical multipotent progenitors. *Dev Biol* **204**, 577-591.
- Maurer-Stroh S, Koranda M, Benetka W, Schneider G, Sirota FL & Eisenhaber F. (2007). Towards complete sets of farnesylated and geranylgeranylated proteins. *PLoS Comput Biol* **3**, e66.
- McKay R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* **276**, 66-71.
- Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE & Roelofs H. (2013). Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med* **2**, 455-463.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH & Nave KA. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* **304**, 700-703.

- Miskimins R, Srinivasan R, Marin-Husstege M, Miskimins WK & Casaccia-Bonnel P. (2002). p27(Kip1) enhances myelin basic protein gene promoter activity. *J Neurosci Res* **67**, 100-105.
- Mizuno H. (2010). Adipose-derived stem and stromal cells for cell-based therapy: current status of preclinical studies and clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 442-449.
- Morita E, Watanabe Y, Ishimoto M, Nakano T, Kitayama M, Yasui K, Fukada Y, Doi K, Karunaratne A, Murrell WG, Sutharsan R, Mackay-Sim A, Hata Y & Nakashima K. (2008). A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. *Exp Neurol* **213**, 431-438.
- Najm FJ, Lager AM, Zaremba A, Wyatt K, Caprariello AV, Factor DC, Karl RT, Maeda T, Miller RH & Tesar PJ. (2013). Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol* **31**, 426-433.
- Najm FJ, Zaremba A, Caprariello AV, Nayak S, Freundt EC, Scacheri PC, Miller RH & Tesar PJ. (2011). Rapid and robust generation of functional oligodendrocyte progenitor cells from epiblast stem cells. *Nat Methods* **8**, 957-962.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM & Trono D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-267.
- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R & Fibbe WE. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **177**, 2080-2087.
- Nave KA & Trapp BD. (2008). Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* **31**, 535-561.
- Neuhuber B, Timothy Himes B, Shumsky JS, Gallo G & Fischer I. (2005). Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Res* **1035**, 73-85.
- Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshminpathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS & Tanavde V. (2008). PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* **112**, 295-307.
- Nishiyama A. (2007). Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS. *Neuroscientist* **13**, 62-76.
- Nistor GI, Totoiu MO, Haque N, Carpenter MK & Keirstead HS. (2005). Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* **49**, 385-396.
- Ohya W, Funakoshi H, Kurosawa T & Nakamura T. (2007). Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat. *Brain Res* **1147**, 51-65.
- Okada Y, Shimazaki T, Sobue G & Okano H. (2004). Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* **275**, 124-142.
- Ono K, Bansal R, Payne J, Rutishauser U & Miller RH. (1995). Early development and dispersal of oligodendrocyte precursors in the embryonic chick spinal cord. *Development* **121**, 1743-1754.
- Ortega HH, Lorente JA & Salvetti NR. (2004). Immunohistochemical study of intermediate filaments and neuroendocrine marker expression in leydig cells of laboratory rodents. *Anat Histol Embryol* **33**, 309-315.
- Orthmann-Murphy JL, Freidin M, Fischer E, Scherer SS & Abrams CK. (2007). Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *J Neurosci* **27**, 13949-13957.

- Owen M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* **10**, 63-76.
- Padhi BK & Pelletier G. (2012). Perturbation of myelin basic protein (Mbp) splice variant expression in developing rat cerebellum following perinatal exposure to methylmercury. *Toxicol Lett* **213**, 374-380.
- Paino CL NM-C, J; Lobo, MVT. (2005). Some neural markers are spontaneously expressed by adipose tissue derived stromal cells in culture. In *Congreso de la SENC*.
- Peters A, Palay SL & Webster Hd. (1978). The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells, by Alan Peters, Sanford L. Palay, and Henry Def. Webster, 395 pp, illustrated, \$33.00, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1976. *Annals of Neurology* **4**, 588-588.
- Petratos S, Gonzales MF, Azari MF, Marriott M, Minichiello RA, Shiphram KA, Profyris C, Nicolaou A, Boyle K, Cheema SS & Kilpatrick TJ. (2004). Expression of the low-affinity neurotrophin receptor, p75(NTR), is upregulated by oligodendroglial progenitors adjacent to the subventricular zone in response to demyelination. *Glia* **48**, 64-75.
- Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, Wood J, Nelander J, Dufour A, Bjorklund A, Lindvall O, Jakobsson J & Parmar M. (2011). Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10343-10348.
- Pham-Dinh D, Mattei MG, Nussbaum JL, Roussel G, Pontarotti P, Roeckel N, Mather IH, Artzt K, Lindahl KF & Dautigny A. (1993). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7990-7994.
- Pieringer RA, Deshmukh DS & Flynn TJ. (1973). The association of the galactosyl diglycerides of nerve tissue with myelination. *Prog Brain Res* **40**, 398-405.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S & Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.
- Poeppel P, Habetha M, Marcao A, Bussow H, Berna L & Gieselmann V. (2005). Missense mutations as a cause of metachromatic leukodystrophy. Degradation of arylsulfatase A in the endoplasmic reticulum. *FEBS J* **272**, 1179-1188.
- Poltorak M, Sadoul R, Keilhauer G, Landa C, Fahrig T & Schachner M. (1987). Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J Cell Biol* **105**, 1893-1899.
- Radtke C, Akiyama Y, Brokaw J, Lankford KL, Wewetzer K, Fodor WL & Kocsis JD. (2004). Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *FASEB J* **18**, 335-337.
- Ramon-Cueto A & Nieto-Sampedro M. (1992). Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* **47**, 213-220.
- Ramón y Cajal S, DeFelipe J, Jones EG & May RM. (1905). *Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system*. Oxford University Press, 1991.
- Redwine JM, Blinder KL & Armstrong RC. (1997). In situ expression of fibroblast growth factor receptors by oligodendrocyte progenitors and oligodendrocytes in adult mouse central nervous system. *J Neurosci Res* **50**, 229-237.
- Río-Hortega Pd. (1920). La glía de escasas radiaciones (Oligodendroglía). *Trab Lab Histol Patol* **1-15**, 1-43.
- Río-Hortega Pd. (1922). ¿Son homologables la glía de escasas radiaciones y la célula de Schwann? *Trab Lab Histol Patol* **16-36**, 1-4.
- Rivera FJ, Kandasamy M, Couillard-Despres S, Caioni M, Sanchez R, Huber C, Weidner N, Bogdahn U & Aigner L. (2008). Oligodendrogenesis of adult neural progenitors: differential effects of ciliary neurotrophic factor and mesenchymal stem cell derived factors. *J Neurochem* **107**, 832-843.

- Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G & Dani C. (2005a). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* **87**, 125-128.
- Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G & Dani C. (2005b). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* **201**, 1397-1405.
- Rodriguez M. (2003). A function of myelin is to protect axons from subsequent injury: implications for deficits in multiple sclerosis. *Brain* **126**, 751-752.
- Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM & Rice HE. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 371-379.
- Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK & Rice HE. (2004). Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Experimental Neurology* **187**, 319-328.
- Sakai N. (2009). Pathogenesis of leukodystrophy for Krabbe disease: molecular mechanism and clinical treatment. *Brain Dev* **31**, 485-487.
- Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K & Okano H. (1996). Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* **176**, 230-242.
- Sambrook F, Maniatis. (2001). Molecular Cloning A laboratory manual. **Third Edition**.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR & Sanberg PR. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* **164**, 247-256.
- Schachner M, Kim SK & Zehnle R. (1981). Developmental expression in central and peripheral nervous system of oligodendrocyte cell surface antigens (O antigens) recognized by monoclonal antibodies. *Dev Biol* **83**, 328-338.
- Scherer SS, Braun PE, Grinspan J, Collarini E, Wang DY & Kamholz J. (1994). Differential regulation of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development. *Neuron* **12**, 1363-1375.
- Schwab ME & Caroni P. (1988). Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* **8**, 2381-2393.
- Schwob JE, Youngentob SL, Ring G, Iwema CL & Mezza RC. (1999). Reinnervation of the rat olfactory bulb after methyl bromide-induced lesion: timing and extent of reinnervation. *J Comp Neurol* **412**, 439-457.
- Shy ME, Hobson G, Jain M, Boespflug-Tanguy O, Garbern J, Sperle K, Li W, Gow A, Rodriguez D, Bertini E, Mancias P, Krajewski K, Lewis R & Kamholz J. (2003). Schwann cell expression of PLP1 but not DM20 is necessary to prevent neuropathy. *Ann Neurol* **53**, 354-365.
- Simons M & Trajkovic K. (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* **119**, 4381-4389.
- Simons M & Trotter J. (2007). Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 533-540.
- Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD & Macklis JD. (2006). Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1477-1497.
- Solanki A & Lee KB. (2010). A step closer to complete chemical reprogramming for generating iPS cells. *Chembiochem* **11**, 755-757.
- Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier MV, Matthieu JM & Zalc B. (1996). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* **18**, 39-48.

- Sommer I & Schachner M. (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytochemical study in the central nervous system. *Dev Biol* **83**, 311-327.
- Sommer I & Schachner M. (1982). Cell that are O4 antigen-positive and O1 antigen-negative differentiate into O1 antigen-positive oligodendrocytes. *Neurosci Lett* **29**, 183-188.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevas CN & Papamichail M. (2006). Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* **24**, 74-85.
- Southwood CM, Fykkelodziej B, Dachet F & Gow A. (2013). Potential For Cell-mediated Immune Responses In Mouse Models Of Pelizaeus-Merzbacher Disease. *Brain Sci* **3**, 1417-1444.
- Spassky N, Heydon K, Mangatal A, Jankovski A, Olivier C, Queraud-Lesaux F, Goujet-Zalc C, Thomas JL & Zalc B. (2001). Sonic hedgehog-dependent emergence of oligodendrocytes in the telencephalon: evidence for a source of oligodendrocytes in the olfactory bulb that is independent of PDGFRalpha signaling. *Development* **128**, 4993-5004.
- Stallcup WB & Beasley L. (1987). Bipotential glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan. *J Neurosci* **7**, 2737-2744.
- Sternberger NH, Itoyama Y, Kies MW & Webster HD. (1978). Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2521-2524.
- Stolt CC, Lommes P, Friedrich RP & Wegner M. (2004). Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development* **131**, 2349-2358.
- Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier MC, Schedl A & Wegner M. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev* **17**, 1677-1689.
- Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U & Wegner M. (2002). Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* **16**, 165-170.
- Su M, Hu H, Lee Y, d'Azzo A, Messing A & Brenner M. (2004). Expression specificity of GFAP transgenes. *Neurochem Res* **29**, 2075-2093.
- Sun T, Pringle NP, Hardy AP, Richardson WD & Smith HK. (1998). Pax6 influences the time and site of origin of glial precursors in the ventral neural tube. *Mol Cell Neurosci* **12**, 228-239.
- Sypecka J. (2011). Searching for oligodendrocyte precursors for cell replacement therapies. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **71**, 94-102.
- Szabo E, Rampalli S, Risueno RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, Levadoux-Martin M & Bhatia M. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* **468**, 521-526.
- Takahashi K & Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L & Salzer JL. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* **47**, 681-694.
- Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Muller B & Zulewski H. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 1135-1140.
- Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L & Zalc B. (1995). Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J Neurosci* **15**, 1012-1024.

- Timsit S, Sinoway MP, Levy L, Allinquant B, Stempak J, Staugaitis SM & Colman DR. (1992). The DM20 protein of myelin: intracellular and surface expression patterns in transfectants. *J Neurochem* **58**, 1936-1942.
- Tomita K, Madura T, Sakai Y, Yano K, Terenghi G & Hosokawa K. (2013). Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience* **236**, 55-65.
- Tropepe V, Sibilio M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF & van der Kooy D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* **208**, 166-188.
- Uccelli A, Laroni A & Freedman MS. (2011). Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol* **10**, 649-656.
- Uccelli A, Milanese M, Principato MC, Morando S, Bonifacino T, Vergani L, Giunti D, Voci A, Carminati E, Giribaldi F, Caponnetto C & Bonanno G. (2012). Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Med* **18**, 794-804.
- Vallstedt A, Klos JM & Ericson J. (2005). Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* **45**, 55-67.
- van Strien ME, Sluijs JA, Reynolds BA, Steindler DA, Aronica E & Hol EM. (2014). Isolation of neural progenitor cells from the human adult subventricular zone based on expression of the cell surface marker CD271. *Stem Cells Transl Med* **3**, 470-480.
- Vellosillo L, Muñoz MP & Paíno CL. (2011). Oligodendrocyte markers spontaneously expressed in cultured adipose tissue-derived stem cells (ADSC). In *XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neurociencia (SENC)*.
- Vellosillo L, Muñoz MP, Toledo-Lobo MV & Paíno CL. (2013). Multiple neural markers are spontaneously expressed by human adipose tissue-derived stromal cells (ADSCs) in culture. In *ESGCT and SETGYC Collaborative Congress*.
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC & Wernig M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**, 1035-1041.
- Wang C, Rougon G & Kiss JZ. (1994). Requirement of polysialic acid for the migration of the O-2A glial progenitor cell from neurohypophyseal explants. *J Neurosci* **14**, 4446-4457.
- Wang J, Pol SU, Haberman AK, Wang C, O'Bara MA & Sim FJ. (2014). Transcription factor induction of human oligodendrocyte progenitor fate and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E2885-2894.
- Wang SZ, Dulin J, Wu H, Hurlock E, Lee SE, Jansson K & Lu QR. (2006). An oligodendrocyte-specific zinc-finger transcription regulator cooperates with Olig2 to promote oligodendrocyte differentiation. *Development* **133**, 3389-3398.
- Watanabe M, Sakurai Y, Ichinose T, Aikawa Y, Kotani M & Itoh K. (2006). Monoclonal antibody Rip specifically recognizes 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* **84**, 525-533.
- Watson RA & Yeung TM. (2011). What is the potential of oligodendrocyte progenitor cells to successfully treat human spinal cord injury? *BMC Neurol* **11**, 113.
- Waxman SG. (2006). Ions, energy and axonal injury: towards a molecular neurology of multiple sclerosis. *Trends Mol Med* **12**, 192-195.
- Wei Q, Miskimins WK & Miskimins R. (2003). Cloning and characterization of the rat myelin basic protein gene promoter. *Gene* **313**, 161-167.
- Weinberg JB, Matthews TJ, Cullen BR & Malim MH. (1991). Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med* **174**, 1477-1482.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA & Jessell TM. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**, 385-397.

- Woodbury D, Reynolds K & Black IB. (2002). Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* **69**, 908-917.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ & Black IB. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* **61**, 364-370.
- Xu X, Cai J, Fu H, Wu R, Qi Y, Modderman G, Liu R & Qiu M. (2000). Selective expression of Nkx-2.2 transcription factor in chicken oligodendrocyte progenitors and implications for the embryonic origin of oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* **16**, 740-753.
- Xu Y, Liu L, Li Y, Zhou C, Xiong F, Liu Z, Gu R, Hou X & Zhang C. (2008). Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose-derived stem cells in vitro. *Brain Res* **1239**, 49-55.
- Yan H & Rivkees SA. (2002). Hepatocyte growth factor stimulates the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci Res* **69**, 597-606.
- Yang N, Zuchero JB, Ahlenius H, Marro S, Ng YH, Vierbuchen T, Hawkins JS, Geissler R, Barres BA & Wernig M. (2013). Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nat Biotechnol* **31**, 434-439.
- Ying C, Hu W, Cheng B, Zheng X & Li S. (2012). Neural differentiation of rat adipose-derived stem cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* **32**, 1255-1263.
- Young L, Sung J, Stacey G & Masters JR. (2010). Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc* **5**, 929-934.
- Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP & Richardson WD. (1994). Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* **12**, 1353-1362.
- Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della Puppa A, Abatangelo G & Cortivo R. (2010). Neural potential of adipose stem cells. *Discov Med* **10**, 37-43.
- Zhou Q, Choi G & Anderson DJ. (2001). The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* **31**, 791-807.
- Zhou Q & Melton DA. (2008). Extreme makeover: converting one cell into another. *Cell Stem Cell* **3**, 382-388.
- Zhu X, Bergles DE & Nishiyama A. (2008). NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* **135**, 145-157.
- Zizioli D, Guarienti M, Tobia C, Gariano G, Borsani G, Bresciani R, Ronca R, Giacomuzzi E, Preti A, Gaudenzi G, Belleri M, Di Salle E, Fabrias G, Casas J, Ribatti D, Monti E & Presta M. (2014). Molecular cloning and knockdown of galactocerebrosidase in zebrafish: new insights into the pathogenesis of Krabbe's disease. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 665-675.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P & Hedrick MH. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 4279-4295.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP & Hedrick MH. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211-228.

